Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/journal-of-phytopathology_1952_19

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
Ret. from binder
16 OCT 1956

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Appel-Berlin, Prof. Dr. E. Baldacci-Mailand, Prof. Dr. H. Braun-Bonn, Prof. Dr. W. B. Brierley-Reading, Prof. Dr. Takewo Hemmi-Kyoto, Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler-Celle, Prof. Dr. K. O. Müller-Cambridge, Prof. Dr. H. M. Quanjer-Wageningen, Prof. Dr. Tr. Savulescu-Bukarest, Prof. Dr. E. C. Stakman-St. Paul

*herausgegeben von*

Prof. Dr. Dr. h. c. **G. Gassner** Braunschweig und Prof. Dr. **E. Gäumann** Zürich

BAND 19

Mit 187 Abbildungen

1952

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Verlag für Landwirtschaft, Veterinärmedizin, Gartenbau und Forstwesen

BERLIN-WEST, LINDENSTRASSE 44-47

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten
Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

# INHALTSVERZEICHNIS ZUM 19. BAND

## Abhandlungen


BLUMER, S., Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von *Poinsettia pulcherrima* Willd. (Mit 4 Abb.) ..... 417

BOCKMANN, H., Der Einfluß der Stickstoffdüngung auf die Halmbruchkrankheit (Lagerfußkrankheit) des Weizens ..... 383

CIPRIANI, P. L., Affinità e disformità tra neoproduzioni vegetali da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. e tumori umani rilevate attraverso indagini cito-chimiche. (4 Fig.) ..... 1

FÜRST, H., Untersuchungen über die Wirkungen von hochmolekularen organischen Stoffen als Spritzmittel gegen Rostpilzinfektion ..... 48

GÄUMANN, E., NAEF-ROTH, ST., REUSSER, P. und AMMANN, A., Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. (Mit 25 Abb. und 11 Tab.) ..... 160

HASSEBRAUK, K., Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. III. (Mit 1 Abb.) ..... 56

HEROLD, F., Untersuchungen zur Rettichschwärze und zur Biologie ihres Erregers *Aphanomyces raphani* Kendr. im Vergleich mit weiteren *Aphanomyces*-Arten. (Mit 25 Abb.) ..... 79

HOCHAPFEL, H., Die Cylindrosporium-Krankheit an Süß- und Sauerkirschen in Europa und Nordamerika. (Mit 6 Abb.) ..... 389

KERN, H., Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici.* (Mit 5 Abb.) .... 351

KLINKOWSKI, M. und USCHDRAWEIT, H. A., Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate, eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit (Mit 4 Abb.) 269

KÖHLER, E., Die Bukettkrankheit, eine Viruskrankheit der Kartoffel. (Mit 16 Abb.) 284

KÖHLER, E., Beiträge zur Kenntnis des A-Virus der Kartoffel. (Mit 2 Abb.) .... 295

LANDOLT, E., Über Welkestoffbildung bei *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. (Mit 1 Abb.) ..... 126

MÜLLER, E., Pilzliche Erreger der Getreideblattdürre. (Mit 6 Abb.) ..... 403

MÜLLER, E. und BIEDERMANN, W., Der Einfluß von $Cu^{+2}$-Ionen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis.* (Mit 3 Abb.) ..... 343

REUSSER, P., Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. (Mit 17 Abb.) ..... 221

Rüdiger, W., Zur pathologischen Anatomie des Leins, *Linum usitatissimum* L. (Mit 10 Abb.) ..... 34

Stapp, C. und Freter, R., Untersuchungen über die Wirkung von 2,4 D im Boden. II. Mitteilung. (Mit 1 Abb.) ..... 20

Turel, F., Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. (Mit 15 Abb.) ..... 307

Verona, O. e Gambogi, P., Una ricerca sull'azione della citrinina prodotta da *Penicillium citrinum* Thom su funghi fitopatogeni. (7 Fig.) ..... 423

Warmbrunn, K., Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. (Mit 10 Abb.) ..... 441

Wilhelm, A. F., Bormangel bei der Weinrebe *Vitis vinifera* L. (Mit 21 Abb.) .. 129

Zobrist, L. und Fröhlich, H., 10 Jahre Versuche zur Bekämpfung des Apfelmehltaues (*Podosphaera leucotricha* [E. et E.] Salm.). (Mit 4 Abb.) ..... 431

## Kurze Mitteilungen

Sauthoff, W., Über Stoffwechselprodukte bei *Botrytis cinerea* Pers. ..... 483

## Besprechungen

Besprechungen ..... 266

# INHALTSVERZEICHNIS

## Heft 1

### Abhandlungen


CIPRIANI, P. L., Affinità e disformità tra neoproduzioni vegetali da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. e tumori umani rilevate attraverso indagini cito-chimiche. (4 Fig.) ..... 1

STAPP, C. und FRETER, R., Untersuchungen über die Wirkung von 2,4 D im Boden. II. Mitteilung. (Mit 1 Abb.) ..... 20

RÜDIGER, W., Zur pathologischen Anatomie des Leins, *Linum usitatissimum* L. (Mit 10 Abb.) ..... 34

FÜRST, H., Untersuchungen über die Wirkungen von hochmolekularen organischen Stoffen als Spritzmittel gegen Rostpilzinfektion ..... 48

HASSEBRAUK, K., Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. III. (Mit 1 Abb.) ..... 56

HEROLD, F., Untersuchungen zur Rettichschwärze und zur Biologie ihres Erregers *Aphanomyces raphani* Kendr. im Vergleich mit weiteren *Aphanomyces*-Arten. (Mit 25 Abb.) ..... 79

LANDOLT, E., Über Welkestoffbildung bei *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. (Mit 1 Abb.) ..... 126


## Heft 2

### Abhandlungen


WILHELM, A. F., Bormangel bei der Weinrebe *Vitis vinifera* L. (Mit 21 Abb.) .. 129

GÄUMANN, E., NAEF-ROTH, ST., REUSSER, P. und AMMANN, A., Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. (Mit 25 Abb. und 11 Tab.) ..... 160

REUSSER, P., Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. (Mit 17 Abb.) ..... 221

**Besprechungen** ..... 266


## Heft 3

### Abhandlungen


KLINKOWSKI, M. und USCHDRAWEIT, H. A., Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate, eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit (Mit 4 Abb.) 269

KÖHLER, E., Die Bukettkrankheit, eine Viruskrankheit der Kartoffel. (Mit 16 Abb.) 284

Köhler, E., Beiträge zur Kenntnis des A-Virus der Kartoffel. (Mit 2 Abb.) .... 295

Turel, F., Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. (Mit 15 Abb.) ..... 307

Müller, E. und Biedermann, W., Der Einfluß von $Cu^{+2}$-Ionen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis*. (Mit 3 Abb.) ..... 343

Kern, H., Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. (Mit 5 Abb.) .... 351

Bockmann, H., Der Einfluß der Stickstoffdüngung auf die Halmbruchkrankheit (Lagerfußkrankheit) des Weizens ..... 383

## Heft 4

### Abhandlungen

Hochapfel, H., Die Cylindrosporium-Krankheit an Süß- und Sauerkirschen in Europa und Nordamerika. (Mit 6 Abb.) ..... 389

Müller, E., Pilzliche Erreger der Getreideblattdürre. (Mit 6 Abb.) ..... 403

Blumer, S., Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von *Poinsettia pulcherrima* Willd. (Mit 4 Abb.) ..... 417

Verona, O. e Gambogi, P., Una ricerca sull'azione della citrinina prodotta da *Penicillium citrinum* Thom su funghi fitopatogeni. (7 Fig.) ..... 423

Zobrist, L. und Fröhlich, H., 10 Jahre Versuche zur Bekämpfung des Apfelmehltaues (*Podosphaera leucotricha* [E. et E.] Salm.). (Mit 4 Abb.) ..... 431

Warmbrunn, K., Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. (Mit 10 Abb.) ..... 441

### Kurze Mitteilungen

Sauthoff, W., Über Stoffwechselprodukte bei *Botrytis cinerea* Pers. ..... 483

*Istituto di Patologia Vegetale e Microbiologia Agraria*
*dell'Università di Pisa*
*Direttore: Prof. O. Verona*

# Affinità e disformità tra neoproduzioni vegetali da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. e tumori umani rilevate attraverso indagini cito-chimiche

per il
Dott. P. L. Cipriani

*4 Fig.*

Numerose ricerche informano sul comportamento degli acidi nucleinici, delle proteine e di altri costituenti essenziali del protoplasma, nel metabolismo cellulare dei tessuti neoplastici animali. Nei vegetali analoghe ricerche sono state eseguite su tessuti normali, ma non sembra, a quanto mi consta, su tessuti patologici, specie e comunque comparativamente, sui tessuti derivanti da proliferazione neoplastica.

Formazione neoplastiche, nei vegetali, sono tutt'altro che infrequenti, se pure dovute a cause diverse sia non parassitarie (traumi, acidi organici, ac. $\beta$-indolacetico, derivati del catrame, ecc.) che parassitarie. Tra queste ultime ben nota è l'azione di alcuni schizomiceti, tipico rappresentante dei quali è *Agrobacterium tumefaciens*.

La natura di tali proliferazioni tumorali delle cullule vegetali è tutt'oggi oggetto di discussioni: il significato dei vari tipi cellulari riconoscibili nella massa tumorale, le analogie possibili tra tali iperplasie vegetali e neoplasie umane, sono ancora campo di opposte vedute.

Nel tentativo di chiarire alcuni di questi punti controversi ho eseguito, su tumori sperimentali da *Agrobacterium tumefaciens* in Ricino, alcune ricerche cito-chimiche sulle quali riferisco.

## Materiale e tecnica

Il materiale è stato ottenuto provocando sperimentalmente la formazione di tumori in giovani piante di *Ricinus communis*, appositamente coltivate in vaso. Più esattamente, su piantine di uno-due mesi furono eseguite inoculazioni, per mezzo di ago, di *Agrobacterium tumefaciens* in colture di 24 ore, preventivamente controllate nello stato di fase. L'attecchimento fu, come di norma, positivo e già dopo sette-dieci giorni apparivano i segni della reazione neoplastica. In seguito i tumori andarono, ovviamente, ingrandendo.

Il materiale fu appunto prelevato da questi tumori, in tre momenti diversi, a circa 15 giorni di distanza l'uno dall'altro e ciò allo scopo di avere

materiale in diverso stadio di sviluppo. A controllo avevamo piante della stessa età non inoculate.

Sul materiale, opportunamente fissato, furono eseguite le seguenti ricerche: 1, acidi nucleinici (ac. timo- e ribo-nucleinico); 2, proteine basiche ed acide; 3, fosfolipidi; 4, „punto isoelettrico relativo". Il materiale è stato in parte fissato in alcool e incluso in celloidina-paraffina (per la ricerca degli acidi nucleinici, delle proteine acide e basiche e la determinazione del punto isoelettrico relativo); in parte in formalina salata al 10 % per le sezioni al microtomo congelatore (per la ricerca delle proteine solforate) e in parte in formalina calcica e in liquido di Bouin diluito per lo studio dei fosfolipidi.

Per lo studio degli acidi nucleinici ho usato i due metodi ormai di uso comune per tale ricerca: per l'acido desossiribonucleico (ATN) il metodo di Feulgen, per l'acido ribonucleinico il metodo di Brachet modificato da Gerola e Vannini [1]).

[1]) È noto che l'impiego della colorazione di Unna-Pappenheim secondo la metodica di Brachet non sempre appare adatta alla ricerca degli acidi nucleinici: è facile osservare infatti una inadeguata ripartizione dei due colori rosso e verde, nei componenti cellulari, che possono colorarsi perfino tutti col primo o con il secondo. Quanta importanza possono avere in ciò la natura dei tessuti esaminati o il fissativo impiegato o la qualità dei coloranti non è facile sempre da riconoscersi. Gerola e Vannini, allo scopo di evitare questi inconvenienti, sono ricorsi all'uso di una miscela colorante in mezzo tamponato: in pratica hanno usato una miscela di verde metile e pironina (0,15 % del primo e 0,25 % del secondo) disciolta a 2 % in acqua distillata (la miscela si altera in pochi giorni!); tale miscela al momento dell'uso viene diluita (1 : 4) nel tampone scelto (serie di McIlvaine) al pH desiderato. Gli Aa. hanno osservato che la ripartizione dei due coloranti può essere modificata a volontà con il variare del pH del mezzo tamponato: infatti procedendo dai valori piu acidi (pH 1,5) a quelli piu basici (pH 11,3) ogni singolo costituente cellulare passa da una esclusiva affinità per la pironina all'affinità per il verde di metile; questo viraggio si verifica a un pH differente per ogni singolo componente cellulare; in particolare esso ha luogo a pH molto acidi per la cromatina nucleare e a pH costantemente piu elevati per i nucleoli e per il citoplasma, con differenze considerevoli nei vari tipi cellulari ed, in misura minore, nei vari tipi di fissazione adoperati.

Gli Aa. hanno ritrovato in questo modo di procedere diversi vantaggi; è possibile infatti con il descritto accorgimento (colorazione a vari pH) trovare un pH del mezzo tamponato che permette una buona colorazione con il verde metil-pironina, qualunque sia il tipo di tessuto esaminato. Anche l'effetto sfavorevole di taluni fissativi, comunemente sconsigliati per questo metodo di colorazione, potrà correggersi con la ricerca del pH piu adeguato. Naturalmente l'impiego della ribonucleasi rimane necessaria come controllo che l'affinità di taluni componenti cellulari per la prionina è correlata con la presenza die ARN.

È poi da considerarsi un secondo vantaggio del metodo in questione: non tutti i componenti cellulari, assai pironinofili, che l'uso della ribonucleasi ci dimostra formati da ribonucleoproteine, mostrano il viraggio verso l'affinità per il verde di metile ad uno stesso pH. Gli Aa. mediante l'uso metodico di varie concentrazioni di ribonucleasi, tanto piu attive quanto maggiormente concentrate, hanno dimostrato che „a parità di tutte le altre condizioni, il differente valore del pH cui corrisponde il viraggio di colorazione è correlato con una diversa abbondanza di acidi ribonucleici nei rispettivi componenti cellulari. Quelle strutture che, nelle colorazioni non precedute dall'azione dell'enzima, debbono raggiungere un pH più elevato per acquistare l'affinità per il verde metile, sono le medesime che necessitano di una ribonucleasi maggiormente concentrata per perdere del tutto l'affinità verso la pironina".

La presenza di proteine a carattere acido e di quella a carattere basico venne rilevata per mezzo della valutazione della differenza dell'intensità di colorazione dei preparati dopo la reazione di MILLON (per la tirosina e i composti fenolici) e dopo quella di THOMAS (che svela la presenza dell'arginina).

Per la ricerca dei fosfolipidi ho seguito il metodo di SMITH e DIETRISH modificato da BAKER. Il metodo proposto da questo A. (acid-hematin test) permette il riconoscimento sia dei fosfolipidi che dei galattolipidi su materiale fissato in formalina calcica; l'inconveniente della contemporanea colorazione di certe proteine può essere evitato mediante opportuno controllo eseguito su materiale dal quale si siano allontanati i fosfolipidi mediante trattamento con piridina a 60 ° (pyridine extractiv test).

La determinazione, infine, del punto isoelettrico relativo dei vari costituenti cellulari venne eseguita secondo il metodo descritto da GEROLA che è una modifica a quello originario di PISCHINGER per il punto isoelettrico apparente [2]).

## Descrizione dei reperti istologici e citochimici

Il tessuto neoplastico prende origine dal parenchima corticale che prolifera in direzione corrispondente all'asse di inoculazione; infatti, come la reazione neoplastica inizia in tal senso, è solo in seguito che il tessuto stesso si estende fino a circoscrivere completamente il fusto, pur assumendo un massimo di sviluppo in corrispondenza del ricordato asse.

Fino dagli stadi iniziali si differenziano nel tessuto neoplastico delle aree nodulari, ben circoscritte, costituite da numerose piccole cellule, rettangolari o allungate, ricche di citoplasma, ad elevato rapporto nucleo-citoplasmatico. A processo inoltrato tali aree si fanno sempre più evidenti; all'esterno di tali ammassi di piccole cellule, si riconoscono elementi di

[2]) E' noto come PISCHINGER propose, per la determinazione del pH intracellulare, un metodo basato sulla colorazione delle sezioni con coloranti acidi e basici in mezzo tamponato, determinando in tal modo la intensità del colore assunto dei vari componenti cellulari nei vari pH. LEVINE è però riuscito a dimostrare che l'impiego di coppie di colori di carica diversa permette la determinazione solo del „punto isoelettrico apparente": infatti il punto isoelettrico cosi determinato è in rapporto alla coppia dei coloranti usati, alla loro concentrazione, al tipo e alla concentrazione delle soluzioni tampone usate ed infine alla fissazione. GEROLA, considerando il valore non assoluto del „punto isoelettrico apparente" e ricordando la difficoltà di avere esatti punti di giudizio, qualora si considerino strutture cellulari a differente densità, ha proposto la determinazione del „punto isoelettrico relativo" tra i costituenti cellulari di un organo. L'A. ha ritenuto più adatto a tale scopo la coppia di coloranti bleu di metile-violetto cristallo (sol. acquose 1 : 1000); si colorano le sezioni esclusivamente in soluzioni tampone di MCILVAINE diluite 1 : 10, a pH 4 e 6,6, alle quali si è preventivamente aggiunto una goccia (per ogni cc di sol. tamp.), rispettivamente di violetto cristallo e di bleu di metile. Le sezioni vengono lasciate nel colorante per 24 h; l'osservazione viene fatta per immersione nella soluzione tamponata corrispondente e dopo montaggio in glicerina bidistillata dove la colorazione si conserva per 24 h. Nel violetto cristallo a pH 4 risulteranno piu colorati i costituenti più acidi della cellula; naturalmente a parità di densità ecc, il colorante elettronegativo, al contrario, colererà più intensamente a pH alquanto elevato (6,6) i costituenti cellulari più basici.

dimensioni nettamente superiori, a forma geometrica, irregolare, fornite di un grosso nucleo. Alcune di queste cellule, le più lontane dalle masse nodulari, sono veramente gigantesche e possiedono un nucleo grande, ma irregolare nei contorni.

Nei tumori di età avanzata le piccole cellule hanno soppiantato quasi completamente gli altri elementi; inoltre non è più dimostrabile la regolare disposizione in ammassi rotondeggianti, perchè delle travate sinuose di piccole cellule rettangolari e allungate infiltrano e scompaginano il tessuto circonvicino, sì che è possibile riconoscere solo alcune isole di cellule ipertrofiche circondate dalle esuberanti travate.

Nei tumori di circa 30 giorni di età è facile riconoscere nell'interno delle aree nodulari una differenziazione che porta alla lignificazione e alla costituzione di pseudovasi spiralati.

## 1. Acidi nucleinici

Nelle aree nodulari le piccole cellule possiedono un citoplasma intensamente pironinofilo, granuloso; il nucleo, di dimensioni leggermente superiori a quelle di un nucleo di cellula corticale normale, ha un colorito rosso, violaceo; nel suo interno si distingue uno o due piccoli nucleoli, paracentrali o addirittura addossati alla membrana nucleare, di colorito rosso scuro. La reazione di Feulgen mette in evidenza la scarsa quantità di ATN presente nel nucleo; è però da sottolineare fin da ora che l'ATN è in questi nuclei in quantità nettamente superiore a quella dei nuclei normali e dei nuclei delle grosse cellule periferiche. Si osservano dei minuti granuli e filamenti Feulgen-positivi, a disposizione diffusa.

Perifericamente alle aree nodulari le cellule, di maggiori dimensioni, presentano un citoplasma vacuolato, molto meno pironinofilo, e un più grande nucleo. Questo è di colore rosa-violaceo e possiede un grosso nucleolo Feulgen-negativo, uniformemente colorato in rosso brillante dalla pironina. La sostanza nucleare Feulgen-positiva è più scarsa che nei nuclei delle cellule precedentemente descritte.

A distanza delle aree nodulari le cellule, sempre di più grandi dimensioni, forse più irregolari nella forma, hanno un citoplasma vacuolato, poverissimo di ARN e un nucleo grande, a contorni irregolari, colorato in rosa-viola; la membrana nucleare a volte è come raggrinzita, a volte non è più distinguibile. Al centro del nucleo si distingue un nucleolo di notevoli dimensioni ma assai poco pironinofilo, specie al centro. La reazione di Feulgen avverte nel nucleo una grande povertà di ATN.

Non notevoli differenze dal punto di vista citochimico tra i tessuti dei tumori di varia età; si ha solo, come si è già accennato, un maggiore sviluppo delle aree nodulari: prevalenza quindi delle cellule del primo tipo.

Nel tessuto normale (con riferimento al parenchima corticale) si osservano cellule regolari, con citoplasma scarsamente pironinofilo, nuclei piccoli di color rosa-violaceo, con piccolo nucleolo Feulgen-negativo.

2. Proteine basiche e acide

Nelle piccole cellule costituenti gli ammassi nodulari si riconosce fortemente positiva la reazione per la ricerca dell'arginina e delle proteine basiche; la colorazione più intensa è del nucleolo; il restante ambito nucleare presenta pure una discreta positività della reazione con una predilezione per una striscia vicino alla membrana nucleare. Nelle grandi cellule periferiche agli ammassi nodulari spicca la intensa positività della reazione nel nucleolo. Le cellule ipertrofiche sembrano invece le meno fornite di basi exoniche.

Debole colorazione si svela con la reazione di Millon per le proteine acide: un poco più intensa è, semmai, al livello dei nucleoli delle cellule piccole.

3. Fosfo-lipidi

Scarsi nel tessuto normale; presenti in discreta quantità nelle cellule del tessuto tumorale, pur rimanendo prevalentemente localizzati nel territorio nucleare. Si nota una certa irregolarità nella presenza di fosfolipidi anche per lo stesso tipo cellulare: sembrano comunque prevalere nelle cellule piccole.

4. „Punto isoelettrico relativo"

Le cellule costituenti la massa tumorale presentano delle sensibili differenze, nei riguardi del punto isoelettrico, a seconda della sede che occupano: le cellule costituenti le aree nodulari dimostrano una particolare affinità per il violetto cristallo a pH acido (corrispondentemente si ha scarsa colorazione delle stesse cellule nel bleu di metile a pH 6,6); il nucleolo ha una tonalità viola leggermente più scura dei rimanenti componenti nucleari; all'intorno del nucleolo si nota una stretta striscia viola pallido; a ridosso della membrana nucleare riappare un colorito viola scuro. Il citoplasma non ha colorazione uniforme; infatti, mentre una stretta striscia perinucleare è di colore violetto pallido, la restante zona periferica è di tonalità viola di poco più chiara di quella del nucleo.

Negli elementi cellulari che circondano le aree nodulari spicca la forte affinità del nucleolo per il violetto cristallo a pH 4; le restanti parti del nucleo e del citoplasma appaiono di un viola più pallido.

Nelle grosse cellule periferiche, mentre rimane sempre evidente una discreta affinità del nucleolo per il violetto cristallo, comincia a delinearsi, specie nel citoplasma, una debole colorazione celeste nei preparati colorati con bleu di metile a pH 6,6.

## Discussione dei reperti e considerazioni

I reperti citologici e citochimici ci permettono di distinguere nella massa tumorale primaria (insorta cioè nel punto di inoculazione di *Agrobacterium tumefaciens*) tre tipi di cellule, rispettivamente con i seguenti caratteri:

1. Cellule costituenti le aree nodulari. Sono cellule di modeste dimensioni, allungate o rettangolari, ricche di citoplasma intensamente pironinofilo per il forte contenuto di ARN, ricco pure di proteine a carattere basico. Il punto isoelettrico relativo è spostato leggermente verso l'acidità. I nuclei sono di dimensioni discrete, con nucleolo paracentrale o addirittura periferico; questo è discretamente ricco di ARN e di proteine a carattere basico. Nel nucleolo il rapporto quantitativo ARN: proteine a carattere basico, deve essere decisamente spostato a favore del primo, data la notevole acidità attuale rivelabile con la determinazione del punto isoelettrico relativo. Scarsa è la quantità di ATN nel nucleo, però maggiore a quella degli altri due tipi di cellule e alle cellule del parenchima corticale normale: si scorgono delle minute granulazioni e filamenti Feulgen-positivi, a disposizione diffusa. I nuclei sono ricchi di fosfolipidi.

2. Cellule disposte alla periferia delle aree nodulari. Le dimensioni di queste cellule sono notevolmente superiori di quelle delle cellule precedentemente descritte. Il citoplasma vacuolizzato si dimostra relativamente povero di ARN; positiva la reazione per l'arginina; i nuclei hanno dimensioni cospicue e possiedono un grosso nucleolo ricco di ARN e di proteine a carattere basico: non tutti i gruppi acidi dei ribonucleotidi sono saturati dai gruppi basici delle proteine rimanendo libere, infatti, molte valenze elettronegative. Nel restante ambito nucleare scarsissimo ATN. In questi nuclei i fosfolipidi sono in quantità minore che nelle cellule precedenti.

3. Grosse cellule periferiche. Sono cellule grandi, a volte gigantesche. Il citoplasma, ampiamente vacuolizzato, appare a volte retratto intorno al nucleo ed è poverissimo di ARN; discretamente positiva la reazione della tirosina. I nuclei, di dimensioni varie, sono per lo più di forma irregolare: si osserva a volte raggrinzimento e, persino, rottura della membrana nucleare. Il nucleo possiede un grosso nucleolo poverissimo di ARN. Debole è la reazione per le proteine nel nucleo e nel nucleolo; la minore affinità per il violetto di cristallo a pH acido dimostra uno spostamento del punto isoelettrico relativo verso pH relativamente più basico, ciò che è confermato dal comportamento in bleu di metile. Pressochè assente è l'ATN nel nucleo; scarsa è pure la quantità di fosfolipidi.

*

Gli Aa. che si sono occupati dei tumori da *Agrobacterium tumefaciens* non sono d'accordo sul significato da assegnare ai diversi tipi di cellule riconoscibili nella massa tumorale.

Smith, nel suo Trattato, considera come vere cellule tumorali quelle costituenti le aree nodulari e le travate sinuose: piccole cellule in attiva moltiplicazione derivanti dalle cellule normali del parenchima corticale stimolate dal batterio. Le grosse cellule che circondano gli ammassi nodulari rappresenterebbero per contro elementi corticali normali, non tumorali,

ipertrofici più che iperplastici, dovuti non alla diretta azione del germe, ma a stimoli indiretti e derivanti dal tessuto tumorale vicino.

Genevés (1946), dopo una serie di ricerche sui tumori da *Agrobacterium tumefaciens* a diversi stadi di sviluppo, ha espresso delle originali conclusioni sulle modalità di crescita della massa tumorale e sul significato dei vari tipi cellulari. Secondo l'A. il movimento inizialissimo delle cellule del parenchima corticale, sotto lo stimolo batterico, è l'ipertrofia, ben presto seguita dalla divisione delle stesse cellule ipertrofiche con formazione di piccole cellule a elevato rapporto nucleo-plasmatico, ipercromatiche: le vere cellule tumorali. Si riconoscerebbero nei tumori giovani numerosi centri che provvederebbero all'accrescimento della massa tumorale per mezzo di due distinti processi: a) per ulteriore suddivisione delle piccole cellule costituenti i centri; b) per divisione delle cellule normali che circondano i centri, cellule che prima si ipertrofizzerebbero e poi si dividerebbero. Tale processo, cosidetto per „apposizione", assumerebbe particolare importanza negli stadi avanzati. L'A. sottolinea che mentre nei tumori giovani l'ipertrofia cellulare decorre parallela all'iperplasia, ad un dato momento dello sviluppo tumorale, invece, si può osservare che all'ipertrofia non fa seguito l'iperplasia. L'alternarsi di tali zone con altre nelle quali continua la suddivisione, porterebbe all'aspetto istologico irregolare dei tumori vecchi. Secondo Genevés l'infiltrazione del tessuto vegetale normale da parte delle cellule tumorali non è dovuta (come pensano invece Smith, Jensen e Magrou) ad una progressiva crescita di travate cellulari dai primi centri di crescita, ma sarebbe legata al fatto che elementi normali, progressivamente distanti, diventerebbero tumorali, prima ipertrofizzandosi e poi dividendosi. E' chiaro quindi che l'A. distingue tra le cellule costituenti la massa tumorale due tipi di cellule, ambedue vere e poprie cellule blastomatose: le „piccole cellule" derivanti in parte dalla divisione di cellule corticali ipertrofiche, periferiche alle masse nodulari, e in parte dall'ulteriore suddivisione anarchica delle stesse piccole cellule; le „cellule grandi" derivanti da cellule corticali che si sono ipertrofizzate senza dividersi.

Recentement Garrigues (1950), dopo alcuni studi sulle atipie mitotiche osservabili nei tumori da *Agrobacterium tumefaciens* ha ripreso la questione della natura e del significato dei vari tipi cellulari osservabili nella massa tumorale. Nei tumori giovani sono distinguibili, socondo l'A., due tipi di cellule: un primo tipo comprende le cellule di media grandezza, associate in travate o in aree nodulari, ricche di citoplasma, con nucleo poco più grande del normale; queste cellule mostrano numerose mitosi le quali, qualunque sia l'età del tumore, sono normali. La frequenza delle mitosi varia con l'età del tumore: frequenti nei tumori giovanissimi, finiscono, con il tempo, per scomparire. Queste cellule deriverebbero dalle cellule corticali sotto lo stimolo batterico e, per la loro moltiplicazione continua e disordinata, costituirebbero la massa principale del tumore: sarebbero le vere cellule tumorali. La seconda categoria comprenderebbe le cellule poste alla periferia delle travate e degli ammassi nodulari: queste cellule, in genere voluminose, avreb-

bero la caratteristica di dividersi in maniera del tutto anormale, con tutti i gradi di anomalie mitotiche. Le mitosi in queste cellule non sarebbero, però, frequenti e, come per le mitosi normali delle cellule della prima categoria, tenderebbero a scomparire nei tumori di età avanzata. Secondo l'A. quest' ultime cellule non dovrebbero essere considerate tumorali, ma rappresenterebbero delle banali cellule corticali che, per la vicinanza del tumore vero e proprio, subiscono uno stimolo che le ipertrofizza e, in parte, le fa proliferare.

Il problema, non ancora chiaramente risolto, può quindi essere così impostato. Nella massa tumorale derivante dalla presenza di *Agrobacterium tumefaciens* si distinguono, sostanzialmente, due tipi di cellule. Le cellule costituenti le aree nodulari debbono, ragionevolmente, essere interpretate come cellule tumorali derivate dalle cellule corticali normali per lo stimolo batterico. Sono tali aree nodulari veri e propri centri germinativi tumorali? Le grandi cellule costituenti la restante massa tumorale rappresentano una figliazione del primo tipo di cellule? O, al contrario, le grandi cellule sono delle normali cellule corticali, ipertrofiche e, in parte, iperplastiche, per gli stimoli loro derivanti dai fenomeni che si svolgono nella vera massa tumorale? Oppure ambedue i tipi di cellule sono cellule blastomatose, rappresentando le piccole cellule una figliazione delle grosse cellule, a lor volta derivate per ipertrofia da elementi corticali normali sotto lo stimolo batterico?

Io credo che, se una risposta può essere data a questi quesiti, tale risposta non può derivare solo dall'analisi dei reperti isto- e citologici; ma questi debbono essere opportunamente integrati dai dati emergenti da alcune ricerche citochimiche dimostratesi particolarmente adatte a fornirci il quadro dello stato funzionale delle cellule attraverso lo studio del comportamento di alcuni componenti chimici delle strutture intracellulari: acidi nucleinici, proteine acide e basiche, fosfolipidi, ecc.

I metodi citochimici ci permettono di localizzare e valutare quantitativamente, nell'interno del nucleo e del citoplasma, numerose sostanze di fondamentale importanza nei processi metabolici cellulari. Di primaria importanza in tutta la serie dei processi vitali si è dimostrato il complesso metabolismo degli acidi nucleici (acido timo- e ribonucleinico). Infatti le ricerche di Caspersson e di Brachet ci hanno permesso di riconoscere gli stretti rapporti esistenti tra gli acidi nucleinici e le sintesi proteiche: sia per le proteine legate alla differenziazione istologica, sia per quelle legate alla crescita plasmatica. Nelle cellule infatti si dovrebbero distinguere due sistemi di formazione delle proteine: uno devoluto alla formazione dei geni, localizzabile nei cromosomi, che sono caratterizzati dall'elevato contenuto di desossiribonucleotidi; l'altro sistema predisposto alla formazione delle proteine citoplasmatiche localizzabile, secondo Caspersson, nel nucleolo e nella eterocromatina ad esso associata („nucleoluassociated chromatin"): i nucleotidi per la sintesi delle proteine citoplasmatiche sarebbero del tipo ribonucleotidi.

Recentemente Gerola si è parzialmente distaccato da tale modo di pensare e, riconoscendo che la cellula può regolare le sue sintesi plasmatiche

o mediante i nucleoli (e quindi l'ARN) o tramite le fisiocromatina[1]) (e quindi l'ATN), ha creduto poter stabilire i seguenti rapporti quantitativi tra i due acidi nelle cellule nei differenti momenti di sviluppo e di funzionalità:

— aumento contemporaneo dei due acidi nucleici quando la cellula assume funzioni multiple (crescita plasmatica e attività secretoria, differenziazione);

— diminuzione contemporanea dei due acidi nucleici (nelle cellule non aventi particolari funzioni);

— aumento dell'ATN, accompagnato da diminuzione dell'ARN nucleolare (cellule ghiandolari stimolate);

— presenza di notevoli quantità di ARN nel nucleolo, con forte diminuzione o addirittura scomparsa della fisiocromatina (cellule a sintesi proteiche non differenziate ed intense).

Nel ciclo del metabolismo proteico cellulare si avrebbe, secondo Caspersson, una semplificazione del modello strutturale delle proteine nucleari con aumento in gruppi basici; ed infatti le basi exoniche (arginina, lisina, istidina) rappresentano il nucleo costitutivo fondamantale per ogni gruppo di proteine. Secondo Edlbacher (1938) la sintesi di nuovi amminoacidi avverrebbe per merito dell'arginina capace di fornire (transaminazione) gruppi aminici ai derivati del metabolismo glucidico e lipidico (chetoacidi); secondo Friedrich-Freska (1940) i gruppi basici costituirebbero la matrice su cui si depongono i gruppi acidi degli acidi nucleinici: attraverso così una serie di negativizzazioni e positivizzazioni si verrebbe alla costituzione delle proteine nucleari. E' possible però che, oltre agli acidi nucleinici, alcuni gruppi prostetici a carattere acido abbiano importanza nei processi di sintesi come, per esempio, alcune proteine coniugate con un gruppo prostetico contenente un polisaccaride legato con legame estereo dell'acido solforico.

Caspersson e Santesson condussero una serie di ricerche tendenti a localizzare e valutare quantitativamente gli acidi nucleinici nelle cellule tumorali umane: riuscirono a delineare una evoluzione della cellula cancerigna comprendente, sostanzialmente, due tipi estremi („excessive A-type" e „excessive B-type") e due intermedi („intermed A-type" e „intermed B-type"): le cellule A hanno un nucleo di modeste dimensioni, ricco di acidi nucleinici, nucleolo piccolo, scarsamente pironinofilo, citoplasma intensamente basofilo per la presenza di forti quantità di ARN. La cellula del tipo B è di dimensioni notevolmente superiori alla precedente e possiede un citoplasma scolorato per l'estrema povertà di ribonucleotidi; il nucleo, in questa cellula, è voluminoso e possiede un grosso nucleolo discretamente

[1]) Gerola ha proposto di denominare f i s i o c r o m a t i n a la sostanza Feulgen-positiva evidenziabile nei nuclei in intercinesi, partendo dalla constatazione che, in tale fase di vita nucleare, l'eterocromatina non puo venire distinta dalla eucromatina nè rispetto alla sua costituzione chimica, nè rispetto alla sua inerzia o attività genica, nè infine rispetto alla sua origine telofasica. In molti nuclei in intercinesi, infatti, è possibile accertare la diminuzione o l'aumento della sostanza eterocromatinica unicamente in dipendenza dello stato fisiologico della cellula stessa.

pironinofilo; estrema è la povertà di acidi nucleinici nel restante ambito nucleare. Tra questi due tipi di cellule esisterebbero due aspetti intermedi caratterizzati dal progressivo aumento del volume cellulare, particolarmente a carico del citoplasma che appare sempre più povero di ARN; il nucleo diventa progressivamente più scolorato, mentre il nucleolo assume proporzioni relativamente gigantesche e si carica di ARN.

La cellula del tipo A rappresenta per Caspersson un elemento in intensa moltiplicazione e crescita (dimostrando un sistema stimolato per la produzione delle proteine endonucleari come appare dalla ricchezza dell'ATN cromosomico); alla divisione segue la crescita, la cui intensità può essere giudicata dall'aspetto del nucleolo e dal contenuto in ARN nel citoplasma; sempre secondo Caspersson, nella cellula di tipo B è riconoscibile, per l'aspetto del suo nucleolo, un sistema attivo per la produzione delle proteine citoplasmatiche, ma tale sistema è bloccato in maniera che manca la formazione di nucleotidi e proteine a livello della membrana nucleare, come invece avviene di norma; il citoplasma è infatti povero di ARN.

Questi dati sono stati confermati ampiamente: Koller si è servito della reazione di Feulgen, ponendo particolare attenzione alle mitosi tumorali; Cusmano si è valso e della reazione di Feulgen e della colorazione con carminio acetico su frammenti schiacciati di tessuto; Barigozzi e Casabona hanno portato il loro studio sui tumori sperimentali da benzopirene nel ratto. Tardini ha confermato la presenza delle cellule del tipo A e B e dei due tipi intermedi nelle neoplasie maligne; nelle iperplasie semplici e nelle neoformazioni benigne l'A. ha potuto riscontrare dei nuclei poco discostantisi da quelli normali e con caratteri citochimici molto simili a quelli dei due tipi intermedi a e b; assai scarsi sarebbero i nuclei paragonabili a quelli delle cellule A. Il Tardini ha concluso che le iperplasie e le neoformazioni benigne possiedono caratteri cariologici propri, distinguibili da quelli dei tessuti normali e da quelli dei tessuti neoplastici.

I reperti citologici e i dati citochimici mi hanno permesso, come si è visto, di distinguere nella massa tumorale insorta in seguito alla inoculazione di *Agrobacterium tumefaciens*, tre tipi di cellule.

Le cellule costituenti i centri nodulari offrono il quadro citochimico delle cellule in attiva divisione e crescita: il loro nucleo ha il più alto contenuto in ATN (relativamente agli altri tipi di cellule e, specialmente, alle cellule normali del parenchima corticale); il nucleolo è piccolo e scarsamente pironinofilo; il citoplasma è ricco di ARN. Sembrerebbe riconoscibile una certa analogia tra questo tipo di cellule e quelle del tipo intermedio A di Caspersson; tali cellule sono state osservate da Tardini nelle iperplasie semplici e nelle neoformazioni benigne. Appare eccessivo un accostamento tra queste „piccole cellule" dei tumori vegetali e le cellule del tipo A di Caspersson dei tumori umani.

L'altro tipo di cellule, costituito dai grossi elementi posti alla periferia delle aree nodulari e delle travate delle „piccole cellule", offre un quadro

citochimico completamente opposto. In queste cellule sembrano prevalere i fenomeni legati alla crescita plasmica; si osserva infatti un voluminoso nucleo, povero di ATN, fornito di uno o due grossi nucleoli intensamente pironinofili e ricchi di proteine basiche; nel citoplasma è fortemente diminuito l'ARN. Sembrano evidenti le analogie tra questo tipo di cellule e quelle del tipo intermedio B di Caspersson; cellule analoghe sono state riconosciute da Tardini nelle iperplasie semplici e nelle neoformazioni benigne.

Il terzo tipo, infine, è rappresentato da grosse cellule che molto rassomigliano le cellule del tipo B di Caspersson sia per i caratteri nucleari, sia per i caratteri citoplasmatici: sono le cellule più voluminose e con nucleo più grande. In esse il citoplasma, ampio e vacuolizzato, è estremamente povero di ARN; nel nucleo si scorgono solo trace di ATN e un nucleolo grosso, a modesto contenuto di ribonucleotidi e di proteine basiche. E' evidente che in tali cellule l'aspetto del nucleolo contrasta con la povertà in acidi nucleinici e in proteine del citoplasma; siamo probabilmente di fronte, cioè, ad un fenomeno analogo a quello ammesso da Caspersson per le cellule del tipo B, dove si assiste ad una stimolazione del sistema formatore delle proteine, ma tale funzione è probabilmente bloccata sì che non avviene, come di norma, la formazione di nucleotidi e proteine a livello della membrana nucleare. E' da sottolineare come in alcune di queste cellule siano riconoscibili fenomeni di sofferenza nucleare.

Che significato hanno questi tre tipi di cellule? E quali rapporti intercorrono tra un tipo ed un altro? E' possibile trovare nei dati precedentemente esposti e commentati una conferma o meno delle varie interpretazioni fornite dagli Aa. che si sono occupati dell'argomento? Abbiamo visto che l'ipotesi più comunemente accettata (Smith, Magrou, Jensen, Garrigues) riconosce solo nelle piccole cellule dei centri nodulari i veri elementi tumorali; le grandi cellule periferiche, le cellule atipiche di Garrigues, sarebbero, a dirla con questo A., „des cellules banales qui, voisines des cellules modifiées en cellules tumorales, ont subit une autre trasformation et donnent directement les atypies observées". Appare però strano che le anomalie di mitosi si riscontrino proprio e solo in queste cellule „banali". E' inoltre da domandarsi su quali basi appoggi l'ipotesi della natura neoplastica delle „piccole cellule"; o se non sia più logico riconoscere nella tumultuosa proliferazione di queste cellule un movimento iperplastico, reattivo all'azione batterica.

In parte contrari all'ipotesi di Genevés mi sembrano i reperti citochimici: l'A. ammette, come si è visto, che il primo movimento cellulare, sotto lo stimolo batterico, sia l'ipertrofia; a questa seguirebbe la divisione cellulare, l'iperplasia; le piccole cellule delle aree nodulari rappresenterebbero, in parte, la figliazione delle grosse cellule periferiche. L'A. ammette che in alcune delle grandi cellule all'accrescimento plasmatico può non seguire la divisione: questo potrebbe trovare conferma nella comparsa di cellule con quadro citochimico analogo a quello delle cellule del tipo B di

Caspersson. E' però difficile legare i quadri funzionali risultanti dai reperti citochimici delle grosse e delle piccole cellule con l'ipotesi di una figliazione di queste da quelle. L'A. stesso si domanda quale può essere la causa capace di indurre a una tumultuosa divisione delle cellule che, per la lenta evoluzione verso l'ipertrofia, sembrano le meno adatte a rappresentare l'elemento progenitore di un movimento proliferativo cellulare: l'A. non trova una sufficiente spiegazione a questo fenomeno.

I tre tipi di cellule rappresentano forse tre aspetti consecutivi dell'evoluzione della cellula tumorale vegetale, analogamente a quello che avviene per le cellule dei tumori umani? Possiamo cioè vedere in esse l'evoluzione descritta da Caspersson, dalla cellula del tipo A a quella del tipo B, attraverso i due stadi intermedi? Si ritornerebbe, in ultima analisi, alla prima interpretazione posta da Smith e sostenuta, allora, da molti Aa. tra i quali Levin e Levine (1925). Tale interpretazione sarebbe veramente suggestiva: le piccole cellule delle aree nodulari mostrano analogie che le avvicinano a quelle del tipo A dei tumori umani, cellule in attiva proliferazione; negli elementi più periferici, esauriti i fenomeni metabolici inerenti alla divisione cellulare, si inizierebbero quelli rivolti ad una intensa crescita plasmatica, come nei tipi intermedi A e B; si giungerebbe infine alle voluminose cellule del terzo tipo, analoghe all'„excessive type B" di Caspersson.

E' però obiettivamente da ammettere un'altra possibilità interpretativa. Logicamente l'intensità di stimolo, legato all'azione batterica, varia nelle diverse zone del parenchima corticale colpito in rapporto alla ripartizione topografica dei batteri; la reazione delle cellule del parenchima corticale potrebbe assumere aspetti sostanzialmente diversi, proprio appunto a seconda dell'intensità di stimolo al quale le cellule sono sottoposte; dove è maggiore la stimolazione si assisterebbe ad un processo tumultuoso di moltiplicazione, con formazione di molteplici focolai nodulari di piccole cellule; per uno stimolo batterico meno intenso, predominerebbero i fonemeni d' ipertrofia cellulare, con la comparsa delle grosse cellule perinodulari, capaci di evolvere solo verso le cellule ipertrofiche del terzo tipo. La masssa neoformata verrebbe così ad essere costituita, sostanzialmente, da due tipi di cellule aventi ambedue lo stesso significato, ad evoluzione però profondamente diversa senza possibilità di passaggio da un tipo all'altro.

Quest'ultima interpretazione trova, nei reperti citochimici e citologici, numerosi dati che la fanno apparire come la più attendibile. Fra l'altro:

— se portiamo l'osservazione, specie nei tumori giovani, nelle zone periferiche della massa tumorale, dove questa confina con il tessuto corticale normale si osserva che la linea di demarcazione è netta, e i reperti citochimici sono profondamente differenti tra le cellule del parenchima normale e le cellule ipertrofiche: in questa zona di confine non si osservano forme di passaggio;

— al limite delle masse nodulari e delle travate di piccole cellule non si osservano forme di passaggio dimostranti una evoluzione verso le cellule ipertrofiche: il limite è netto specie in base ai reperti citochimici;

— le atipie mitotiche si osservano proprio nelle cellule grandi; mancano assolutamente nelle piccole cellule, delle quali, invece, tumultuosa ne è la proliferazione.

Sembrerebbe anzitutto logico che le „grandi cellule" costituiscano la massa neoformata insieme alle „piccole cellule" e con analogo significato; le „grandi cellule" non rappresenterebbero, cioè, la „reazione perifocale" del parenchima corticale normale allo stimolo che parte dai nodi di „piccole cellule". Appare inoltre poco probabile che le „piccole cellule" dei centri nodulari possano subire una evoluzione verso l'ipertrofia nucleo-citoplasmatica, trasformandosi in „grandi cellule".

Nei tumori umani in stadio avanzato prevalgono quantitativamente le cellule del tipo regressivo; nei tumori vegetali di età avanzata si osserva che le piccole cellule soppiantano quasi completamente le cellule ipertrofiche: ciò è per lo meno strano se si ammette una evoluzione delle cellule dei centri nodulari in elementi ipertrofici; è, al contrario, facilmente intuibile se immaginiamo due tipi di cellule ad evoluzione propria, delle quali, a lungo andare, prevalgono quelle che più tumultuosamente proliferano.

*

Esistono dunque delle analogie tra neoformazioni vegetali e tumori umani? I dati della letteratura e l'analisi comparativa dei reperti citochimici dovrebbero permetterci un ulteriore passo in avanti verso la risoluzione di questo problema.

E' noto che certe antiche posizioni che ammettevano una stretta analogia tra i tumori del regno vegetale e animale sono state in seguito superate.

Genevés recentemente così scriveva: „En définitive, si l'on a pu trouver des aspects histologiques communs aux cancers animaux et aux tumeurs végétales du tipe crown-gall, l'étude de la formation de ces dernières infirme l'homologie que l'on avait cru souvent pouvoir y reconnaitre. C'est de la répartition des processus d'hyperplasie et d'hypertrophie dans les differentes parties de la tumeur, de leur juxtaposition ou de leur disjonction dans les diverses cellules que dépend la formation des grandes et des petites cellules des tumeurs agées et leur disposition respective. L'évolution des diverses cellules de ces tumeurs se fait sans migrations, sans infiltrations de cellules tumorales."

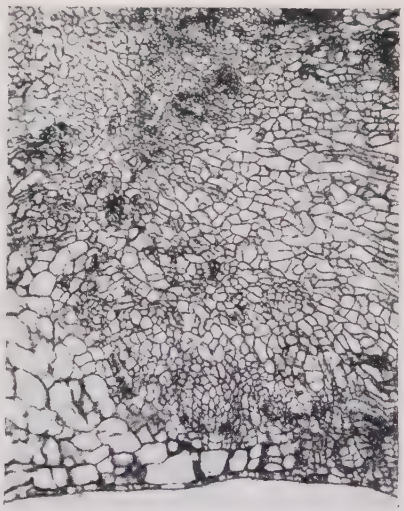


Fig. 1. Istologia di una neoplasia formatasi su stelo di fagiolo a seguito dell'applicazione dell'ac. $\beta$-indolacetico (da Kraus, 1936). (Si noti come il quadro istologico si presenti paragonabile a quello presentato dalle neoplasie dovute ad infezioni da *Agrobacterium tumefaciens.)*

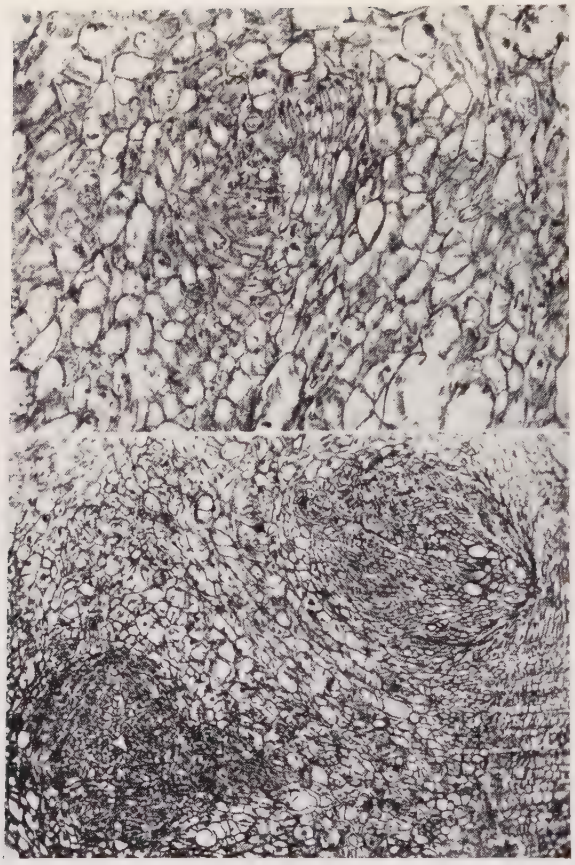


Fig. 2. In alto: stadio iniziale della formazione di un'area nodulare nel parenchima corticale in un tumore di 15 giorni.
In basso: due noduli di „piccole cellule" nella massa neoplastica in tumore di 30 giorni

Smith stesso (1922) dovette rivedere le sue prime affermazioni; aveva ammesso nel 1916, seguito da Jenssen, (1918) e da Magrou, che nei tumori di età avanzata l'infiltrazione del tessuto normale da parte delle cellule tumorali vegetali, costituiva una chiara prova dell'omologia di questi tumori con quelli umani e animali in genere. Riconobbe poi che l'accrescimento del tumore e l'invasione dell'organismo vegetale potevano avvenire oltre che per un processo di infiltrazione, anche per il fenomeno della „apposizione".

Garrigues (1950) ha fatto rilevare „que le crown-gall et le cancer ne peuvent être mis sur le même plan, mais que les tumeurs à *Phytomonas tumefaciens* forment une première categorie de tumeurs neoplastiques qui se placent avant les néoplasies cancéreuses de l'homme et des animaux, neoplasies qui montrent le maximum de malignité".

Gli stessi Levin e Levine che pure tanto insistettero sulla somiglianza dei crown-gall coi tumori umani, dovettero in seguito ammettere che la vegetazione patologica di *Agrobacterium tumefaciens* sia piuttosto una reazione protettiva della pianta contro il parassita.

Rondoni ha recentemente ammesso una sostanziale differenza: mentre il vero tumore degli animali, una volta iniziato da certi stimoli, prosegue la sua crescita anche se gli stimoli sono cessati, il tumore vegetale avrebbe bisogno per lo sviluppo dello stimolo continuo dei prodotti del metabolismo batterico. Sembra all'A. che nel tumore vegetale la cellula non cambi profondamente la sua natura da diventare così autonoma come nei veri blastomi animali.

Io credo che in realtà non esista tale sostanziale differenza. Alcuni ricercatori (Smith 1917; Kraus, Brown, Hammer 1936; Brown e Gardner 1936; Boivin e altri 1936; ecc.) hanno studiato le neoproduzioni riproducibili nelle piante con estratti di *Agrobacterium tumefaciens* o con sostanze isolate da tali estratti come l'acido $\beta$-indolacetico. Krauss e coll. applicarono ad es. su stelo di fagiolo o su ferite prodotte mediante taglio di un rametto una pasta di lanolina e ac. $\beta$-indolacetico; rapidamente cioè nel giro di 15—30 giorni si formarono tumori aventi a comune con quelli prodotti dal germe vivo non solo i caratteri istologici, ma anche la stessa evoluzione, la formazione di nodi secondari, ecc. È da notare che la pasta lanolinica veniva applicata una sola volta. Sembrerebbe quindi che le neoproduzioni vegetali rappresentino veramente una crescita eccessiva, a carattere autonomo.

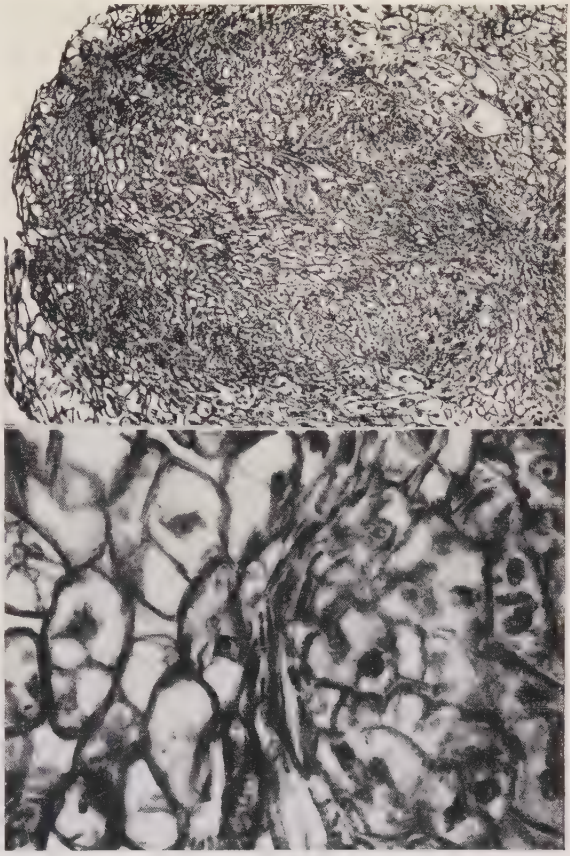


Fig. 3. In alto: grosso nodulo di „piccole cellule" in tumore di 45 giorni con pseudovasi spiralati.
In basso: zona limite di un nodulo; a destra le „piccole cellule", a sinistra le „grandi cellule"

Sembra, da questo brevissimo esame della letteratura, che non si possa concludere per una analogia stretta: nè, secondo me, tale analogia può sussistere data la diversa organizzazione dei soggetti (animali e vegetali). Esistono peraltro punti di contatto ed, in alcuni aspetti, analogie apparenti. I reperti citochimici prima analizzati sembrano indicare che, se qualche punto di contatto esiste con i tumori umani, esiste piuttosto con le neoplasie benigne.

## Conclusioni

Sono state eseguite su tumori sperimentali da *Agrobacterium tumefaciens* su Ricino alcune ricerche citochimiche nel tentativo di chiarire il significato — tutt'ora discusso — dei vari tipi cellulari riconoscibili nella massa tumorale e di determinare le analogie possibili tra tali neoproduzioni vegetali e le neoplasie umane.

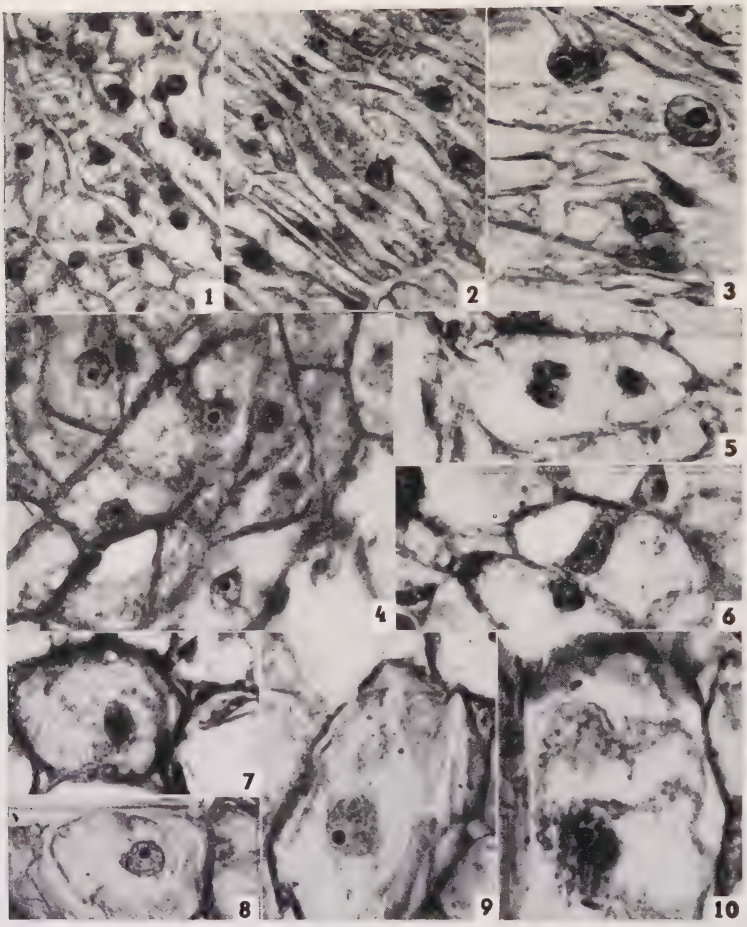



Fig. 4. 1, 2, nuclei di „piccole cellule"; 3—8, nuclei di „grandi cellule": in 5 cellula trinucleata e in 6 un nucleo con due nucleoli; 9—10, nuclei di „cellule giganti".
(Si noti l'intensa pironinofilia del nucleolo delle „grandi cellule"; in 9 la scomparsa della membrana nucleare e in 10 l'inizio del processo cariolitico.) Colorazione verde metile-pironina in mezzo tamponato a pH 6,6; × 960 ca.

1. Nella massa neoformata, insorta in seguito all'inoculazione di *Agrobacterium tumefaciens*, sono riconoscibili, in base ai reperti citologici e citochimici, tre tipi di cellule:

   a) cellule piccole (che compongono le formazioni nodulari disseminate nella massa neoformata): offrono il quadro citochimico delle cellule in attiva divisione e crescita. Sono apparentemente analoghe alle cellule del tipo intermedio A (CASPERSSON) dei tumori animali.

   b) cellule grandi (alla periferia delle aree nodulari disseminate nella massa neoformata): offrono il quadro citochimico delle cullule in

esuberante crescita plasmica. Apparentemente, sono analoghe alle cellule del tipo intermedio B (Caspersson) dei tumori animali.

c) cellule giganti (alla periferia della massa neoformata): offrono il quadro citochimico delle cellule tumorali in fase regressiva. Apparentemente sono analoghe alle cellule del tipo eccessivo B (Caspersson) dei tumori animali.

2. I reperti citologici (atipie, anormalità nelle mitosi) e citochimici sono favorevoli al concetto della natura neoplastica sia delle piccole cellule delle aree nodulari sparse nella massa, come delle grandi cellule periferiche della massa neoformata.

3. I tre tipi cellulari, nonostante le apparenze, non sono da intendere tutti e tre come aspetti consecutivi di evoluzione della stessa cellula vegetale irritata, contrariamente a quanto avviene per le cellule di molti tumori umani. La neoformazione vegetale è costituita, primitivamente, da due tipi di cellule (le piccole e le grandi cellule).

4. Le piccole derivano dalle cellule corticali in corrispondenza dei centri di maggiore irritazione; prevale l'iperplasia nella loro evoluzione. Le grandi cellule derivano dalle cellule corticali in corrispondenza delle zone più periferiche e meno irritate; nella loro evoluzione prevale l'ipertrofia.

Le cellule giganti sono secondaria trasformazione delle grandi cellule.

## Zusammenfassung

Experimentell ausgelöste Tumore von *Agrobacterium tumefaciens* auf *Ricinus communis* wurden zytochemisch auf ihre Beziehungen zu menschlichen Tumoren untersucht. Das Bestehen strenger Analogien zwischen pflanzlichen und menschlichen Tumoren wird verneint. Die pflanzlichen Tumore entstehen als Reaktion der Wirtszelle auf den bakteriellen Reiz; sie erinnern zytochemisch an gutartige Geschwüre des Menschen.

## Summary

The author has made many cytochemical analysis of the tumours, produced experimentally on plants of *Ricinus* sp. by *Bacterium tumefaciens*, in order to obtain evidence of the possible affinity between vegetable tumours and human tumours.

The author cannot agree that there is an analogy between vegetable and animal tumours. He considers that vegetable tumours are a reaction of the host cell to the bacterial stimulus; this reaction is, cytochemically, somewhat like that of benign human tumours.

## Résumé

L'auteur a effectué quelques analyses cytochimiques de tumeurs, obtenues expérimentalement sur le ricin par l'*Agrobacterium tumefaciens*, dans

le but de mettre en évidence d'éventuelles relations entre les tumeurs végétales et les tumeurs humaines. Il nie l'existence d'analogies strictes entre les tumeurs végétales et les tumeurs animales. Les tumeurs végétales sont le produit d'une réaction de la cellule végétale au stimulus bactérien; cette réaction se rapproche, dans le cadre de la cytochimie, de celle des tumeurs bénignes humaines.

## Bibliografia


Boivin, A., Mesrobeanu, L., Marbe, M., Juster, P. e Savulescu T., 1936. Sur la production de tumeurs chez la plante, au moyen de l'endotoxine non protéique du *Bacterium tumefaciens*. III. Congr. Int. de Pathologie comparée.

Brachet, J., 1940. La detection histochimique des acides pentosenucléiques. C. R. Soc. Biol., **133**, 88—90.

— —, 1942. La localisation des acides pentosonucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'Amphibiens en voie de développement. Arch. Biol., **53**, 207—257.

— —, 1948. Le rôle et la localisation des acides nucleiques au cours du développement embryonnaire. C. R. Soc. Biol., **142**, 1241—1254.

Brown, N. L. and Gardner, F. E., 1936. Galles produced by plant hormones, including a hormone from *Bacterium tumefaciens*., Phytopathology, **26**, 708—713.

Casabona, U., 1947. Prime osservazioni sui nuclei neoplastici da benzopirene. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **23**, 9—11.

Caspersson, T., 1936. Über den chemischen Aufbau der Struktur des Zellkernes. Skand. Arch. Physiol., **8**, 73.

— —, 1940. Die Eiweißverteilung in den Strukturen des Zellkernes. Chromosoma, **5**, 562.

— —, 1949. The nucleus in normal and pathological cells studied with quantitative cytochemical methods. In: Acidi nucleici, proteine e differenziamento normale e patologico. Scritti raccolti dal Seminario di Biologia della Facoltà di Scienze dell'Università di Milano. Ed. Rosenberg et Sellier, Torino.

— — e Landstrom-Hyden e Aquilonius, L., 1941. Citoplasmanucleotide in Eiweiß produzierenden Drüsenzellen. Chromosoma, **2**, 11.

— — e Schultz, J., 1940. Ribonucleic acid in both nucleus and cytoplasm and the function of the nucleolus. Proc. Nat. Acad. Sc., **26**, 567.

Cornil, L. e Stahl, A., 1950. Teneur comparée en acides ribonucléique et désoribonucleique des tumeurs bénignes et malignes. C. R. Soc. Biol., **144**, 1075—1077.

Davidson, I. C. e Leslie, I., 1950. Nucleic acids in relation to tissue growth: a review. Cancer Res., **10**, 587—594.

Genevés, M. L., 1946. Recherches sur la formation de deux catégories cellulaires dans les tumeurs corticales de la tomate. Rev. Gen. de Botan., **633**, 381—428.

Gerola, F. M., 1950. Il metabolismo proteico nel processo fecondativo e nella embriogenesi delle Angiosperme. Pont Acc. d. Sc. (Commentationes), **14**, 1—96.

— — e Vannini, E., 1949. La colorazione con verde di metile pironina in mezzo tamponato nella ricerca degli acidi ribonucleici. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., **25**, 1—3.

Garrigues, R., 1950. Les atypies mitotiques dans les tumeurs à Phytomonas tumefaciens. C. R. Soc. Biol., **144**, 1457—1458.

— —, 1950. Sur l'origine des cellules atipiques dans le cancer et les tumeurs à *Phytomonas tumefaciens*. C. R. Soc. Biol., **144**, 1459—1460.

Hammer, K. C. e Kraus, E. J., 1937. Histological reactions of bean plants to growth promoting substances. Bot. Gaz., **98**, 733—807.

Jensen, C. O., citato da Genevés M. L.

Kisser, J. e Lindenberg, L., 1940. Untersuchungen über die Wirkung karzinogener Substanzen auf höhere Pflanzen. Jahrb. f. wissenschaftliche Botanik, **89**, 90—155.

Kraus, E. J., Brown, N. A. e Hammer, K. C., 1936. Histological reactions of bean plants to indolacetic acid. Bot. Gaz. **98**, 370—420.

Levine, N. D., 1940. The determination of apparent isoelectric points of cell structures by staining at controlled reactions. Stain Techn. 22.

Levin, J. e Levine, M., 1925. A comparative cytological study of neoplasm in animals and vegetals. J. Cancer Res., **9**, 11—41.

Magrou, J., 1924. Recherches experimentales sur le cancer des plantes. Ann. Ist. Pasteur, **38**, 851—872.

— —, 1928. Etudes sur les galles produites par le *Bacterium tumefaciens*. Ann. Sc. Nat. Bot., **10**, 545—584.

Pischinger, A., 1926. Die Lage des isoelektrischen Punktes histologischer Elemente als Ursache ihrer verschiedenen Färbbarkeit. Ztschr. f. Zellf., **3**, 169.

Rondoni, P., 1946. Il cancro. Ed. CEA., Milano.

Smith, E. F., 1916. Studies of the crown-gall of plants. Its relation to human cancer. Cancer Res., **6**, 231—308.

— —, 1917. Mechanisms of tumor growth in crown-gall. J. Agr. Res., **8**, 165—188.

— —, 1922. Appositional growth in Crown-gall tumors and in Cancer. Cancer Res., **7**, 1—49.

Tardini, A , 1949. Vedute antiche e moderne sulla diagnosi citologica dei tumori. Riv. Anat. Pat. Onc., **2**, 173—190.

— —, 1949. Contributi personali allo studio dei caratteri cariologici di alcuni processi iperplastici e neoplastici. Atti Soc. It. di Patologia, I ° Congresso Roma 1949.

Thomas, L. E., 1946. A histochemical test for arginine-rich proteins. J. Cell. Comp. Physiol., **28**, 145.

*Aus dem Institut für Bakteriologie und Serologie der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig-Gliesmarode*
*Direktor: Oberregierungsrat Dr. C. Stapp*

# Untersuchungen über die Wirkung von 2,4 D im Boden

## II. Mitteilung: Die Reaktion von Bodenbakterien auf den Wuchsstoff

Von
C. Stapp und R. Freter

*Mit 1 Abbildung*

Wie aus unserer ersten Mitteilung ersichtlich ist, beschränkt sich in deutschen Böden die Haltbarkeitsdauer der 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure (2,4 D) auf einen Zeitraum von wenigen Wochen. Es erhebt sich nun die Frage, ob dieser Wuchsstoff außer seiner zeitlich begrenzten direkten Wirkung nicht noch dadurch indirekt das Wachstum von Kulturpflanzen beeinflußt, daß er die Bakterienflora des Bodens schädigt oder verändert. Auch hierüber sind in der angelsächsischen Literatur eine Reihe von Arbeiten zu finden.

Stevenson und Mitchell (1945) stellten fest, daß *Bac. subtilis, Aerobacter cloacae, Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas tumefaciens* durch 0,02 % 2,4 D gehemmt werden. 0,08 % 2,4 D verhinderten das Wachstum dieser Stämme mit Ausnahme von *Aerobacter cloacae. Fusarium sp.* und *Penicillium sp.* wurden durch 0,08 % 2,4 D nicht merklich beeinflußt.

Smith und Mitarb. (1945) geben an, daß 2,4 D bis zu einer Konzentration von 0,05 % keinen Einfluß auf Actinomyceten, Pilze und Protozoen ausübt. Nach Lewis und Hamner (1946) ist 0,1 % 2,4 D ohne Einfluß auf 10 Species von Bakterien und Pilzen. Culler (1946) untersuchte einige Species von *„Phytomonas"* und stellte fest, daß sie durch 0,1 % 2,4 D gehemmt werden, während *Rhizopus nigricans* und einige andere Pilze erst bei einer Konzentration von 4 % auf den Wuchsstoff reagierten.

Kloke (1951) fand bei Actinomyceten und Pilzen eine wachstumshemmende 2,4 D-Wirkung bei Konzentrationen von 0,02—0,1 %. Die „Keimung von Bakterien", wie er schreibt, wurde in seinen Versuchen bei 0,02 % 2,4 D gehemmt, während die Keimzahl im Boden sich durch 2,4 D-Wirkung nicht wesentlich änderte, selbst wenn so hohe Dosen wie 25 kg/ha angewandt wurden.

Mehrere Autoren berichten über den Einfluß des pH auf die Wirksamkeit der 2,4 D. Martin (1946) untersuchte die Keimzahlen von Bakterien, Actinomyceten und Pilzen in verschieden vorbehandelten Böden und stellte dabei fest, daß hohe Konzentrationen (0,1 bis 1 %) 2,4 D in alkalischem Boden die Mikroflora nicht reduzierten, daß aber nach einer gewissen Zeit ein Ansteigen der Keimzahlen erfolgte. In saurem Boden war dagegen noch nach 160 Tagen das Pilzwachstum gering. Bei Anwendung von 0,01 % 2,4 D war die Bakterienzahl in sauren Böden ebenfalls zunächst geringer und stieg dann wieder an.

Dubos (1946) behandelte einige menschenpathogene Bakterienarten mit sieben verschiedenen Wuchsstoffen (darunter auch 2,4 D) und stellte bei allen einen Anstieg der wachstumshemmenden Wirkung mit fallendem pH fest. Zu dem gleichen Ergebnis kam Newman (1947) bei Versuchen mit Bodenbakterien.

Carlyle und Thorpe (1947) sowie Payne und Fults untersuchten die Einwirkung von 2,4 D auf die Knöllchenbakterien bei Leguminosen. Sie fanden dabei eine Abnahme der Knöllchenzahl bei Gegenwart geringer 2,4 D-Konzentrationen, welche weder das Wachstum der Leguminosen noch die Entwicklung der Knöllchenbakterien in vitro beeinflußten. Fults und Payne (1947) stellten vergleichende Ausstrich-Präparate aus dem Knöllcheninhalt von Leguminosen her, die in wuchsstoffreien und in 2,4 D-haltigem Boden gewachsen waren. In den Knöllchen wuchsstoffbehandelter Leguminosen seien mehr kurze und weniger lange Bakterien als in den Knöllchen unbehandelter Kontrollpflanzen zu finden gewesen.

Nach Abschluß des experimentellen Teiles dieser unserer zweiten Mitteilung erschien noch eine deutsche Arbeit, und zwar von Flieg und Pfaff (1951), in der die Verf. hinsichtlich des Einflusses von 2,4 D auf mikrobiologische Prozesse zu dem Schluß kommen, daß sich in Nährlösung von den untersuchten Umsetzungen nur die Nitrifikation als empfindlich gegenüber normalen Gaben von 2,4 D erwies, in Gegenwart von Boden die Wirkung aber abgeschwächt war; es sei dann bei Mengen von 1 kg/ha keine der geprüften Umsetzungen mehr wesentlich beeinträchtigt worden. Erst Gaben von 100 und 1000 kg/ha hätten bei Atmung und Nitrifikation stärkere Depressionen hervorgerufen.

Über eine exakt festgestellte, das Bakterienwachstum fördernde Wirkung des Wuchsstoffes haben wir keine Angaben in der Literatur gefunden.

Den Arbeiten aller zitierten Autoren kann man also entnehmen, daß 2,4 D auf die untersuchten Bakterien, mit einziger Ausnahme der nitrifizierenden, erst in verhältnismäßig hohen Konzentrationen, nämlich etwa 0,01 bis 0,1 %, hemmend einwirkt. Trotzdem verdienen diese Feststellungen auch von seiten der Praxis eine gewisse Beachtung, denn nach Anwendung von 2,4 D zur Unkrautbekämpfung (meist wird 1 kg/ha 2,4 D als 0,1prozentige Lösung gespritzt) kann der 2,4 D-Gehalt des Bodenwassers zumindest in den oberen Schichten durchaus in dem für Bakterien toxischen Bereich liegen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es nun, die Empfindlichkeit einiger wichtiger Arten von Bodenbakterien gegen 2,4 D zu ermitteln. Da bisher fast alle Autoren lediglich die Dichte des Bakterienwachstums oder die Größe und Anzahl von Kolonien als Kriterium für einen Einfluß des Wuchsstoffes benutzt hatten, wollten wir außerdem die Verläßlichkeit dieser groben Methodik durch vergleichsweise Untersuchung der erfahrungsgemäß leichter zu beeinflussenden biochemischen Leistungen einiger Bakterien überprüfen. Unsere im folgenden beschriebenen Versuche wurden, wenn nicht ausdrücklich anders angegeben, mit dem reinen Natriumsalz der 2,4 D ausgeführt. Die zitierten Autoren arbeiteten jedoch teilweise auch mit anderen Salzen und mit der reinen Säure.

## 1. Wirkung auf die Wachstumsintensität der Stämme

Die Wachstumsintensität wurde nach dreitägiger Bebrütung bei 26 ° C mit bloßem Auge durch Vergleich der Dichte des Bakterienrasens auf wuchsstoffhaltigem Kartoffelagar (pH 7,3) mit dem Wachstum auf einem entsprechenden Kontrollnährboden ohne Zusatz von 2,4 D ermittelt. Die Zellulosezersetzer wurden auf Papieragar[1]) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

*) Papieragar nach Fåhraeus (abgewandelt): $NaNO_3$ 0,2; $K_2HPO_4$ 0,1; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,05; KCl 0,05; $CaCl_2 \cdot 6\,H_2O$ 0,02; $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,002; $MnSO_4 \cdot 4\,H_2O$ 0,0002; Agar 1,5; Wasser 100; Oberfläche des Schrägagars mit saugfähigem Papier bedeckt.

*Tabelle 1*

Wachstum verschiedener Stämme auf 2,4 D-haltigem Agar

| Stamm | % 2,4 D | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,4 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,025 | Kontr. |
| *Bac. asterosporus* | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. mycoides* | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. fusiformis* | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. subtilis* | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. megaterium* | 2 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. carotarum* | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. tumescens* | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Azotomonas insolita* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Azotobacter chroococcum* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Pseud. fluorescens* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Pseud. pyocyanea* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. prodigiosum* | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Mycobact. phlei* | 1 | 1 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| *Bac. amylobacter* | — | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 |
| *Cellvibrio sp.* | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 |
| *Sporocytophaga sp.* | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |

Zeichenerklärung: 0 = kein Wachstum 2 = gut sichtbares Wachstum
1 = schwaches Wachstum 3 = starkes Wachstum

Es ist daraus ersichtlich, daß eine Hemmung der Entwicklung der meisten Bakterienspezies erst bei 0,2 % 2,4 D eintrat. In einigen Fällen schwankten die Ergebnisse in den Wiederholungen etwas. Dies mag an geringen Verschiedenheiten im pH und vielleicht, wenn auch weniger, im Nährstoffgehalt gelegen haben. Auffallenderweise gehörten aber alle Sporenbildner zu den empfindlicheren Arten, wobei *Bac. subtilis* als aerober und *Bac. amylobacter* als anaerober Sporenbildner sich sogar als noch empfindlicher erwiesen als die übrigen geprüften Vertreter der Gattung *Bacillus*. An Empfindlichkeit übertroffen wurden diese aber noch von den Zellulosezersetzern, von denen die untersuchte *Sporocytophaga* sogar schon durch 0,025 % 2,4 D in ihrem Wachstum stark behindert war.

Die in Tabelle 1 aufgeführten Mikroorganismen wurden auch in ihrem Verhalten zu 2,4 D mikroskopisch kontrolliert. In denjenigen Kulturen, die infolge eines höheren 2,4 D-Gehaltes im Wachstum stärker gehemmt waren, zeigten sich ganz allgemein gewisse Degenerationserscheinungen, die sich z. B. durch Fadenbildung, Krümmungen und Aufblähungen kenntlich machten. Bei den Sporenbildnern traten auch in niedrigeren 2,4 D-Konzentrationen (etwa 0,1 %) insofern Wirkungen zutage, als die Sporenbildung gegenüber derjenigen der Kontrollkulturen zeitlich verzögert einsetzte oder aber auch gänzlich unterblieb. So war es z. B. nicht möglich, Subkulturen aus 24 Tage alten, 0,1 % 2,4 D enthaltenden Schrägagarkulturen von *Bac. asterosporus* und *Bac.*

*mycoides* zum Anwachsen zu bringen, während nach Abimpfung aus den entsprechenden wuchsstofffreien Kontrollkulturen ein dichtes Wachstum erzielt wurde.

Um zu prüfen, ob eine Verstärkung der 2,4 D-Wirkung zu erhalten sei, wenn einige Stämme durch mehrfache Passagen über wuchsstoffhaltige Nährböden geführt würden, wurde von einer Kartoffelwasserkultur mit einem pH von 7,3 und einem 2,4 D-Gehalt von 0,05 % bzw. einer Kontrollkultur ohne 2,4 D-Zusatz ausgegangen. Daraus wurde in insgesamt acht Passagen auf Kartoffelagarplatten (pH 7,3) mit entsprechendem Wuchsstoffgehalt überimpft und von diesen wieder in Kartoffelwasser usw. Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Überimpfungen wurden zuerst lang gehalten (8 bis 14 Tage) und dann bis auf drei Tage verkürzt. Alle Kulturen wurden im Brutraum bei 26° C aufbewahrt. Der Versuch wurde durchgeführt mit: *Bac. mycoides, Bac. asterosporus, Pseud. fluorescens, Bact. prodigiosum, Mycobact. phlei, Sarcina flava* und *Cellvibrio sp.* Die *Sporocytophaga* kam wegen ihrer hohen Empfindlichkeit für diese Passageversuche nicht in Betracht.

Mit Ausnahme des *Cellvibrio* und abgesehen von der schon erwähnten Verzögerung der Sporenbildung zeigte sich nach den acht Passagen weder in der Wachstumsintensität noch in der Kolonieform und dem mikroskopischen Bild der anderen auf 2,4 D-haltigen Medien gezüchteten Stämme ein Unterschied gegenüber den entsprechend weitergeimpften Kontrollkulturen. Der *Cellvibrio* wuchs nach ein bis drei Passagen bei 0,05 % 2,4 D-Gehalt zunächst langsamer und schwächer als in der Kontrollkultur und dann überhaupt nicht mehr. Das gleiche Verhalten zeigte der Stamm beim Wachstum auf Papieragar mit 0,05 % 2,4 D-Gehalt. — Die Wirkung von 2,4 D läßt sich demnach durch Passagen bei wenig empfindlichen Bakterien nicht steigern.

Kloke (1951) gibt an, daß das Unkrautbekämpfungsmittel U 46, welches nach seinen Angaben mit 2,4 D identisch ist, schon in einer Konzentration von 0,02 % jede „Keimung von Bakterien" verhindert. Da in unseren Versuchen mit Reinkulturen in Kartoffelwasser und auf Kartoffelagar nur in Ausnahmefällen eine v o l l s t ä n d i g e Hemmung des Bakterienwachstums eintrat, stellten wir zur Klärung dieser Diskrepanz den von Kloke beschriebenen Versuch mit verschiedenen Nährböden an:

1. Mit Kartoffelagar (pH 7,3) unter Zusatz von U 46,
2. Mit Kartoffelagar (pH 7,3) unter Zusatz von 2,4 D,
3. Mit dem von Kloke benutzten neutralen Nährboden (0,2 % $NaNO_3$; 0,1 % $K_2HPO_4$; 0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,05 % KCl; 3 % Zucker; 1,5 % Agar) unter Zusatz von U 46).

Je 10 ccm der verschiedenen Nährböden erhielten einen Zusatz von je 1 ccm Wuchsstofflösung, die so angesetzt worden war, daß nach dem Vermischen die Gesamtkonzentration des Bodens an Wuchsstoff 0,1 bzw. 0,0125 Prozent betrug. Als Kontrolle wurde je 1 ccm dest. Wasser auf 10 ccm Nährboden gegeben. Die verwendeten Wuchsstofflösungen bzw. das dest. Wasser

hatten vor Ansetzen des Versuches über Nacht offen an der Luft gestanden. Die relative Anzahl von Kolonien, die sich nach dreitägiger Bebrütung bei 26 ° C auf den zu Platten ausgegossenen Nährböden entwickelt hatten, ist in Tabelle 2 angegeben.

*Tabelle 2*
Relative Keimzahlen in unsterilen Wuchsstofflösungen

| Nährboden | Konzentration der Wuchsstoffe | | |
|---|---|---|---|
| | 0,1 % | 0,0125 % | Kontrolle |
| 1 | 80 | 100 | 100 |
| 2 | 80 | 100 | 100 |
| 3 | 1,5 | 62 | 100 |

Die absolute Keimzahl auf dem Nährboden 3 war etwas geringer als auf den anderen Substraten. Man muß deshalb annehmen, daß die hemmende Wirkung der 2,4 D auf dem synthetischen Nährboden (3) durch dessen an sich schon ungünstigere Wachstumsbedingungen verstärkt worden ist. Die Wirkung der 2,4 D auf Bakterien hängt also recht wesentlich von dem verwendeten Substrat ab. —

Diese Feststellung gestattet, die unterschiedlichen Angaben der eingangs zitierten Autoren, von denen einige schon bei 0,01 % 2,4 D eine hemmende Wirkung beobachteten, während andere noch bei 0,1 % keinen Einfluß zu erkennen vermochten, u. a. auch mit der Benutzung verschiedener Nährmedien zwanglos zu erklären.

Es fragte sich nun, welche Substrateigenschaften die Erde hinsichtlich der 2,4 D-Wirkung besitzt. Folgender Versuch gibt darüber Auskunft. Zwei sterile Reagenzgläser wurden mit genau gleichen Mengen (3 g) Komposterde (pH 6) gefüllt und eines davon mit 1 ccm 0,1prozentiger 2,4 D-Lösung versetzt, während das andere eine entsprechende Wassermenge erhielt. Nach 23tägiger Aufbewahrung bei 26 ° C wurden beide Erdproben mit steriler physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und je eine Verdünnungsreihe in genau gleicher Weise daraus hergestellt. Aus der letzten Verdünnung jeder Reihe wurden Kartoffelagar-Platten gegossen (pH 7,3), die entweder 0,1 % 2,4 D bzw. einen entsprechenden Wasserzusatz enthielten. Nach zwei Tagen waren auf den Platten nachstehende Wuchsergebnisse festzustellen (Prozentangaben bedeuten die relative Anzahl von Kolonien bezogen auf die Kontrollplatte [1]):

1. Platte ohne 2,4 D aus unbehandelter Erde 100 %
2. Platte mit 2,4 D aus unbehandelter Erde 80 %
3. Platte ohne 2,4 D aus Erde mit 2,4 D-Zusatz 80 %

Eine Vorbehandlung von Erde mit 2,4 D vermindert also die Anzahl der auf reinem Kartoffelagar auswachsenden Keime um 20 % (3. Versuch).

Die gleiche Wirkung läßt sich aber auch erzielen, wenn man zum Kartoffelagar 0,1 % 2,4 D hinzufügt und diesen mit einer Aufschwemmung aus unbehandelter Erde beimpft (2. Versuch). Demnach muß also die Wirkung des Wuchsstoffes in der untersuchten Erde etwa gleich stark wie in alkalischem Kartoffelagar sein.

Die Versuche 1 und 3 wurden mit kürzerer Einwirkungszeit (vier Tage) des Wuchsstoffes auf die Erde wiederholt. Auch hierbei bewirkte die 2,4 D eine Verminderung der Keimzahlen auf etwa 80 %, ein Ergebnis, das mit den Angaben von Kloke gut übereinstimmt. — Da die Erde in unseren Versuchen mit 0,1prozentiger 2,4 D-Lösung, der praktisch angewandten Konzentration, behandelt wurde, wird man auch in der obersten Bodenschicht eines mit 2,4 D gespritzten Feldes einen Rückgang der Bakterienflora auf etwa 80 % annehmen dürfen. Da jedoch die auf die Oberflächeneinheit des Feldes gelangende Spritzmenge sehr klein ist, wird auch die Hemmungszone nur von sehr geringer Tiefe sein. Weiter in den Boden hinein kann der Wuchsstoff nur durch Auswaschung oder Diffusion gelangen, wobei sich die Konzentration rasch vermindern muß. Da wir gezeigt haben, daß eine Wirkung der 2,4 D auf Kartoffelagar nur in Ausnahmefällen noch unterhalb von 0,1 % auftritt (Tabelle 1) und daß man ferner mit einigem Recht aus der 2,4 D-Wirkung in Kartoffelagar auf die Wirkung in Erde schließen kann, dürfte in tieferen Bodenschichten der schädigende Einfluß des Wuchsstoffes auf die untersuchten Bodenbakterien nur gering sein.

## 2. Beeinflussung der biochemischen Leistungen

Bei der Auswertung der bisher beschriebenen Versuche muß auf Grund der angewandten Methodik ein gewisser Vorbehalt gemacht werden. Die Bestimmung von Keimzahlen und Wachstumsintensitäten stellt nämlich eine recht ungenaue und wenig empfindliche Untersuchungsmethode dar, die nur größere Schädigungen der Bakterien zu erkennen gestattet, was den Untersucher möglicherweise zu einer Unterschätzung der 2,4 D-Wirkungen veranlassen könnte. Deshalb wurden einige biochemische Eigenschaften von Bodenbakterien unter Einfluß von 2,4 D untersucht, um festzustellen, ob sich nicht auf diese Weise eine Wirkung geringerer Wuchsstoffkonzentrationen zeigen würde.

### a) Reduktion von Farbstoffen

Die Reduktion von Methylenblau wurde in zwei bis drei Tage alten Kartoffelwasser-Kulturen (Bebrütung bei 26 ° C) untersucht, die bestimmte Konzentrationen von 2,4 D enthielten. Geprüft wurden *Bac. asterosporus* und *Azotomonas insolita*. Die Ergebnisse zweier Versuche sind in Tabelle 3 dargestellt. Man ersieht daraus, daß auch bei Anwendung dieser Untersuchungsmethode keine Beeinflussung der Bakterien unterhalb von 0,1 % 2,4 D festzustellen ist. Wie in den in Tabelle 1 dargestellten Versuchen war auch hier der Sporenbildner der deutlich empfindlichere.

*Tabelle 3*
Hemmung der Reduktion von Methylenblau

| Stamm | 2,4 D - Gehalt der Kulturen in % | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0.125 | 0,1 | 0,0625 |
| *Bac. asterosporus* | — | + | ± | ± | ± | ± | — |
| *Azotomonas insolita* | — | + | + | + | ± | — | — |

Zeichenerklärung: + = vollständige Hemmung der Reduktion
± = schwache Hemmung der Reduktion
— = keine Hemmung der Reduktion

Um sicherzugehen, daß die Hemmung der Reduktion durch 2,4 D direkt und nicht etwa als sekundäre Folge eines makroskopisch nicht erkennbaren schwächeren Wachstums durch den Wuchsstoff verursacht worden ist, wurde folgender Versuch angestellt: Eine Kartoffelschrägagar-Kultur von *Bac. asterosporus* wurde mit physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt und diese Abschwemmung in zwei gleiche Portionen geteilt, die beide einen gleichen Zusatz von Methylenblau erhielten. Die eine Portion bekam außerdem einen Zusatz von 0,1 % 2,4 D. Nach einigen Stunden war das Methylenblau in der Kontrolle reduziert, in der mit 2,4 D behandelten Aufschwemmung dagegen unverändert blau. Da beide Aufschwemmungen gleiche Keimzahlen besaßen, war also in diesem Falle der Reduktionsstoffwechsel unmittelbar gehemmt worden.

Auch in Schrägagar mit Lackmuszusatz zeigte sich bei *Bac. asterosporus* und *Bac. mycoides* eine Reduktion des Farbstoffes. Diese wurde jedoch durch Zusatz von 0,1 % 2,4 D vollständig gehemmt.

b) Gelatineverflüssigung

Je 5 ccm Kartoffelgelatine (10 %; pH 7,3) wurden in Röhrchen abgefüllt und mit 1 ccm dest. Wasser bzw. mit 2,4 D-Lösung versetzt. Nach dem Beimpfen wurden die Kulturen im Brutraum bei 26 ° C aufbewahrt und kamen zur Prüfung der Erstarrungsfähigkeit an jedem folgenden Tage für eine halbe Stunde in ein Wasserbad von 13 ° C. Untersucht wurden *Bac. asterosporus* und *Bac. mycoides*.

*Tabelle 4*
Gelatineverflüssigung

| Bebrütungszeit in Tagen | Gehalt der Gelatine an 2,4 D in % | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 | 0,2 | 0,1 | 0,05 | 0,01 | |
| 2 | 1/4 + | — | — | 1/4 + | 1/4 + | *Bac. mycoides* |
| 3 | + | — | — | 1/3 + | 2/3 + | |
| 8 | + | 1/3 + | + | + | + | |
| 4 | — | — | — | — | — | *Bac. asterosporus* |
| 5 | + | — | — | + | + | |
| 7 | + | — | + | + | + | |

Zeichenerklärung: + = Die Gelatine war vollständig verflüssigt
1/3 + = Die Gelatine war nur im oberen Drittel der Kultur verflüssigt
— = Die Gelatine war nicht verflüssigt

Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß 2,4 D die Verflüssigung von Gelatinekulturen verzögerte. Die hemmende Wirkung des Wuchsstoffes beginnt danach in Gelatine bereits bei 0,01 % 2,4 D für *Bac. mycoides* am dritten Tage sichtbar zu werden, während für *Bac. asterosporus* erst ab 0,1 % am fünften Tage die Verzögerung in der Verflüssigung sich zeigt. Diese Reaktion ist also etwas empfindlicher, als die bisher geschilderten es sind.

c) Reduktion von Nitrat

Den bei 26 ° C bebrüteten Kulturen von *Bac. asterosporus, Bac. mycoides* und *Azotomonas insolita* in Kartoffelwasser mit 1 % $NaNO_3$ wurden an jedem Tage Proben steril entnommen und auf ihren Nitrit- und teilweise Nitratgehalt mit α-Naphthylamin-Sulfanilsäure bzw. Diphenylamin-Schwefelsäure untersucht. Tabelle 5 gibt die in einigen Versuchen erhaltenen Ergebnisse wieder.

*Tabelle 5*

Reduktion von Nitrat

| Stamm | Ablesung nach einer Bebrütungszeit v. Tagen | Konzentration von 2,4 D in den Kulturen in % | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 | 1 | 0,5 | 0,25 | 0,125 | 0,0625 | 0,031 | 0,015 |
| *Bac. asterosporus* | 1 | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ |
| | 2 | ++ | —<br>+ | —<br>+ | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| *Bac. mycoides* | 1 | ++ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | + | + | + | ++ |
| *Azotomonas insolita* | 2 | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ |
| | 3 | —<br>+ | (+)<br>+ | (+)<br>+ | (+)<br>+ | (+)<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ |
| | 5 | —<br>— | —<br>+ | —<br>+ | (+)<br>+ | (+)<br>(+) | —<br>— | —<br>— | —<br>— |
| | 6 | —<br>— | —<br>+ | —<br>+ | —<br>+ | —<br>— | —<br>— | —<br>— | —<br>— |

Zeichenerklärung:

Oberes Zeichen
Reaktion mit α-Naphthylamin-Reagens
++ = Rotfärbung mit Trübung
\+ = Rotfärbung ohne Trübung
(+) = schwache Rotfärbung
— = keine Färbung

Unteres Zeichen
Reaktion mit Diphenylamin-Reagens
\+ = Blaufärbung
(+) = schwache Blaufärbung
— = keine Färbung

*Bac. asterosporus* zeigte eine teilweise Hemmung der Nitratreduktion am zweiten Tage erst durch etwa 0,25 % 2,4 D, *Bac. mycoides* war bei diesen Versuchen etwas empfindlicher, denn 0,03 % hemmten hier schon nach 24 Stunden. Aus Kulturen von *Azotomonas insolita* war nach fünf Tagen in den Bereichen von 0,0625 bis 0,015 % 2,4 D bereits das Nitrat aus dem Nährsubstrat restlos verschwunden, ohne daß dabei eine Reduktion zu Nitrit als Zwischenprodukt nachzuweisen möglich gewesen wäre. Das spricht dafür, daß das Nitrit im gleichen Tempo, in dem es aus dem Nitrat entsteht, weiter abgebaut wird. Bei den Konzentrationen von 0,125 bis 1 % 2,4 D war Nitrit nach drei Tagen aber schwach nachweisbar und nach fünf Tagen nur noch bei 0,125 und 0,25 %.

Die Empfindlichkeit dieser Reaktion erreicht also weder bei *Bac. asterosporus* noch bei *Bac. mycoides* die gleiche Höhe wie diejenige der Gelatineverflüssigung.

d) Säurebildung aus Dextrose

Es wurden *Bac. asterosporus* und ein zufällig als Verunreinigung aufgetretener Sporenbildner (Stamm 3 B), der durch sein eigenartiges Verhalten auffiel, untersucht. In Vorversuchen wurde als beste Methode die Kultur bei 26° C auf Kartoffelagar-Platten mit Zusatz von 1 % Dextrose und Lackmus ermittelt. Es zeigte sich, daß *Bac. asterosporus* die Agarplatte unter Einwirkung von 0,1 % 2,4 D ebenso schnell und intensiv rötete wie die Kontrollplatte, obgleich sein Wachstum stark gehemmt war. Da bei viel geringerer Entwicklung also eine gleich starke Säurebildung auftrat, mußte demnach diese Eigenschaft des Stammes durch den Wuchsstoff stimuliert worden sein. Der nach zwei bis drei Wochen sich einstellende Reaktionsumschlag der Kontrollplatte in den alkalischen Bereich unterblieb im Agar mit 0,1 % 2,4 D.

Eine Steigerung dieses Effektes zeigte der oben erwähnte Stamm 3 B. In normalen, dicht bewachsenen Plattenkulturen auf 1 % Dextrose-Agar war die Säurebildung so schwach, daß zwar die Farbe von Bromthymolblau noch umschlug, jedoch bei Lackmuszusatz der Agar rein blau blieb. Die mit 0,1 % 2,4 D und Lackmusindikator versetzten Plattenkulturen röteten sich nach zwei- bis dreitägiger Bebrütung dagegen vollständig, obgleich das Wachstum zuweilen etwas schwächer war als in der Kontrolle. In Lackmus-Indikator-Platten mit 0,1 % 2,4 D ohne Zuckerzusatz trat keine Säurebildung auf. Die beschriebene Wirkung des Wuchsstoffes zeigte sich noch bis herab zu einer Konzentration von 0,03 %.

Auch mit Hilfe dieser Reaktion ließ sich also keine größere Wirksamkeit der 2,4 D feststellen als bei vorher beschriebenen.

Die eigenartige stimulierende Wirkung von 2,4 D auf die Säurebildung kann wohl am zwanglosesten damit erklärt werden, daß der Wuchsstoff eines oder mehrere der am Zuckerabbau beteiligten Fermente der untersuchten Stämme spezifisch hemmt, so daß sich ein saures Zwischenprodukt anreichert. Diese Annahme läßt sich noch durch die Beobachtung stützen, daß der auf eine Lackmus-Dextrose-Platte ausgestrichene und nachher mit dem gleichen

Agar überschichtete Stamm 3 B — wohl infolge des geringeren Sauerstoff-Partialdruckes — intensiv Säure bildete.

e) Stickstoffbindung durch *Azotobacter chroococcum*

Das Wachstum von *Azotobacter chroococcum* auf stickstofffreiem Nährboden[1]) mit 0,1 % 2,4 D bei 26 ° C wies keine makroskopisch erkennbaren Unterschiede gegenüber einer Kontrollkultur auf. Eine genaue Stickstoffbestimmung wurde in flüssigen Kulturen von *Azotobacter* (100,00 ccm stickstofffreie Nährlösung, teilweise mit 0,1 % 2,4 D-Zusatz) nach der Kjeldahlmethode durchgeführt. Diese Ergebnisse gibt Tabelle 6 wieder.

*Tabelle 6*

Stickstoffbindung von *Azotobacter chroococcum*

| Stamm Nr. | Kultur | mg N | = % |
|---|---|---|---|
| 1 | Kontrolle | 8,75 | 100 |
| 1 | 0,1 % 2,4 D | 6,72 | 77 |
| 2 | Kontrolle | 6,30 | 100 |
| 2 | 0,1 % 2,4 D | 6,50 | 103 |

Es ist daraus ersichtlich, daß die Stämme unterschiedlich reagierten und daß nur Stamm 1 stärker gehemmt wurde, dagegen Stamm 2 eine wenn auch nur schwache Tendenz einer Förderung erkennen ließ. Diese immerhin merkwürdigen Ergebnisse stimmten jedoch durchaus überein mit Befunden von Flieg und Pfaff.

f) $CO_2$-Produktion

Die Kohlensäureabgabe wurde in einem Luftstrom von 2 l/h gemessen, der mit Hilfe wassergefüllter 60 l-Glasballons durch die Saugwirkung des langsam herausströmenden Wassers erzeugt wurde. Der in die Versuchsgefäße eintretende Luftstrom mußte vorher zwei Waschflaschen mit konzentrierter Natronlauge und eine Waschflasche mit Barytlauge passieren. Das $CO_2$ der austretenden Luft wurde in zwei hintereinandergeschalteten Waschflaschen mit n/50 Barytlauge abgefangen. Die Titration erfolgte mit n/10 HCl. Die Apparatur stand in einem Kellerraum bei konstanter Temperatur von 21 ° C. Zwei Versuchsgefäße, denen nur das vorgeschaltete Luftreinigungssystem gemeinsam war, konnten gleichzeitig durchströmt werden.

Zunächst wurden Versuche mit Reinkulturen von *Bac. mycoides* angesetzt. Zur Wahrung der Sterilität wurde hierbei vor und hinter die beiden Versuchsgefäße (100 ccm Erlenmeyerkölbchen) je eine Flasche mit Sublimatlösung geschaltet, die im Aufsatz einen Wattefilter enthielt. Jedes Versuchsgefäß wurde mit 10 ccm Kartoffelwasser (pH 7,3) gefüllt, eines bekam einen

[1]) Dextrose 2 %; $K_2HPO_4$ 0,1 %; $CaCO_3$ 0,1 %; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,05 %; $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,005 %; $Na_2MoO_4$ 0,005 %; Agar 0,1 %.

Zusatz von 0,01 % 2,4 D. Vor dem Beimpfen wurden die Versuchsgefäße zusammen mit den beiden vor- und hintergeschalteten Waschflaschen zwei Stunden lang im Autoklaven bei 115 ° C sterilisiert. Nach vier Tagen Versuchsdauer waren in der Kontrollkultur 14,37 mg und in der mit 0,01 % 2,4 D versetzten Kultur 16,28 mg $CO_2$ (also 0,52 mg pro Tag mehr) entwickelt worden. In einem weiteren Versuch wurden je 200 g Komposterde nach Zugabe von 0,1 % $CaCO_3$ zwei Stunden lang im Autoklaven bei 1,5 atü sterilisiert und danach mit je 1 ccm einer Kartoffelwasser-Kultur von *Bac. mycoides* beimpft. Eine Erdprobe bekam einen Zusatz von 28,3 ccm 0,01prozentiger 2,4 D-Lösung[1]), die andere erhielt eine gleiche Menge dest. Wassers. Der Versuch wurde in Fernbach-Kolben von 18 cm Durchmesser durchgeführt. In vier Tagen wurden in der Erde mit 2,4 D-Zusatz 41,22 mg $CO_2$, in der nur mit Wasser versetzten Erde 42,88 mg $CO_2$ entwickelt. Während also im ersten Versuch in Kartoffelwasser eine geringe Förderung der $CO_2$-Produktion durch den Wuchsstoff verursacht wurde, trat in Erde eine sehr geringe Hemmung auf.

Der zweite Versuch wurde auch mit verschiedenen nicht sterilisierten Erdproben durchgeführt. Bei diesen Versuchen wurden die sublimatgefüllten Waschflaschen weggelassen. Täglich wurde die entwickelte Menge $CO_2$ bestimmt. Die für Komposterde (pH 5,7) erhaltenen Werte gibt Abb. 1 wieder.

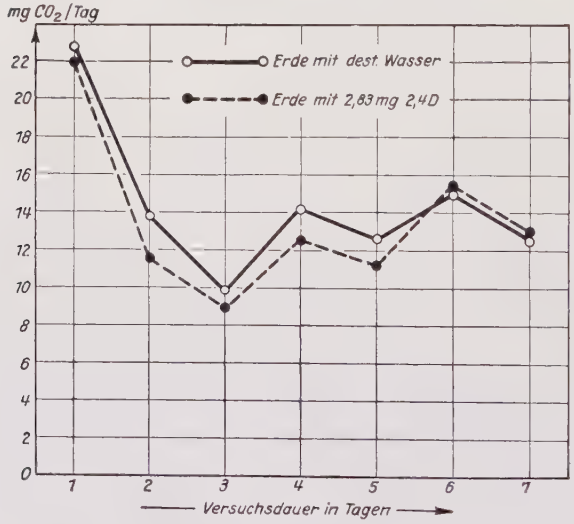



Abb. 1. Atmungsversuch mit Komposterde

Daraus wird eine schwache Hemmung der $CO_2$-Produktion während der ersten fünf Tage erkenntlich, wonach dann wieder etwa gleiche Kohlensäuremengen gebildet wurden. Es ist also anzunehmen, daß in fünf Tagen die größte Menge des zugegebenen Wuchsstoffes abgebaut wurde. Sandboden (pH 5,8) zeigte im gleichen Versuch keine Hemmung der $CO_2$-Produktion, ebenso wie eine Komposterde von anderer Herkunft, aber gleichem Säuregrad, wie die im ersten Versuch benutzte. Wenn Flieg und Pfaff bei vier verschiedenen Böden nach sieben und auch nach 62 Tagen meist noch eine schwache Hemmung in der $CO_2$-Entwicklung feststellen konnten, so dürfte das auf die Verwendung andersartiger Böden und die andere Methodik zurückzuführen sein. Trotzdem muß angenommen werden, daß eine Gabe von 1 kg/ha 2,4 D keinen praktisch bedeutsamen Einfluß auf die Bodenatmung ausübt. —

[1]) etwa 1 kg/ha entsprechend.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß durch Untersuchung der biochemischen Leistungen einiger Bakterien in mehreren Fällen schon eine hemmende Wirkung bei solchen 2,4 D-Konzentrationen festgestellt werden konnte, die hinsichtlich der Wachstumsintensität oder der Koloniegröße keine Unterschiede gegenüber einer Kontrollkultur mehr verursacht hatten. Die wirksamen Konzentrationen lagen jedoch alle noch in der Größenordnung von 0,1 % bis 0,01 %, was bis auf die Nitrifikation, die von uns bisher noch nicht geprüft worden ist, den Angaben der einleitend zitierten Autoren entspricht.

### 3. Wirkung auf die Knöllchenbildung bei Leguminosen

Diese Versuche wurden ähnlich, wie bei CARLYLE und THORPE beschrieben, ausgeführt. Irdene Blumentöpfe wurden mit Quarzsand gefüllt und vor der Einsaat sechs Stunden lang bei 160° C sterilisiert. Eine Reihe größerer Töpfe wurde mit je 20 Lupinen-, eine zweite Reihe von kleineren Töpfen diffus mit Rotkleesamen besät. Der Sand wurde mit stickstofffreier Nährlösung[1]) auf 60 % seiner Wasserkapazität angefeuchtet und mit folgenden 2,4 D-Mengen versetzt:

| | Lupinen | | Rotklee | |
|---|---|---|---|---|
| Topfdurchmesser | 16 cm | | 12 cm | |
| Sandmenge | 3000 g | | 900 g | |
| Topf Nr. | % 2,4 D [2]) | = kg/ha | % 2,4 D | = kg/ha |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0,000394 | 1 | 0,000617 | 1 |
| 3 | $5.10^{-5}$ | 0,13 | $5.10^{-5}$ | 0,08 |
| 4 | $5.10^{-6}$ | 0,013 | $5.10^{-6}$ | 0,008 |
| 5 | $5.10^{-7}$ | 0,0013 | $5.10^{-7}$ | 0,0008 |

Jeder Topf erhielt die gleiche Menge einer Aufschwemmung entsprechender Knöllchenbakterien. Die Töpfe standen offen im Gewächshaus, ohne daß weiterhin auf Sterilität geachtet wurde. An jedem Morgen wurde der Gewichtsverlust der Töpfe durch dest. Wasser ersetzt.

Alle Pflanzen in den Töpfen 4 und 5 entwickelten sich normal, d. h. wie in Topf 1. In Topf 3 waren die Pflanzen gehemmt und am Ende des Versuchs nach 72 Tagen nur halb so groß wie die Kontrollpflanzen. Der Rotklee erreichte in den Töpfen 1, 4 und 5 eine Höhe von 15 cm, die Lupinen von 40 cm, letztere kamen zum Blühen. In Topf 2 entwickelten sich nur drei kümmernde Exemplare von Lupinen und fünf von Rotklee. In allen Töpfen hatten die Pflanzen nach 72 Tagen reichlich Wurzelknöllchen gebildet, ohne daß ein zahlen- oder größenmäßiger Unterschied festzustellen gewesen wäre. Nur in Topf 2 hatten sich, der geringeren Größe des Wurzelwerks ent-

[1]) $CaSO_4$ 0,08 %; $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,02 %; $CaHPO_4$ 0,02 %; $K_2HPO_4$ 0,02 %; $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,02 %.

[2]) auf den Wassergehalt bezogen.

sprechend, weniger Knöllchen gebildet. Die kleinen, in Topf 4 und 5 angewandten 2,4 D-Mengen hatten demnach bei längerer Kulturdauer keinen nachteiligen Einfluß auf die Entwicklung von Leguminosen. Die von Carlyle und Thorpe nach 34tägiger Kultur an Rotklee (bei den auch von uns in Topf 4 und 5 angewandten 2,4 D-Konzentrationen) bemerkte Hemmung der Knöllchenbildung — bei sonst gleichem Aussehen der Pflanzen — ist in unseren Versuchen, wenn überhaupt vorhanden gewesen, nach der doppelten Versuchszeit wahrscheinlich verschwunden, ohne schädigende Auswirkungen gezeigt zu haben.

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuche ergeben also, daß die 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure nur in hohen Konzentrationen auf die von uns geprüften Mikroorganismen einwirkt. In vielen Versuchen begann sich überhaupt erst ab 0,1 % 2,4 D-Gehalt eine Wirkung zu zeigen, niemals aber fanden wir eine starke Reaktion von Bakterien auf geringere Konzentrationen als 0,1 %. Die Untersuchungen sollen mit anderen Mikroorganismen fortgesetzt und auf andere mikrobielle Prozesse ausgedehnt werden. Dabei soll auch die Nitrifikation mit einbezogen werden, weil die an diesem Vorgang beteiligten Mikroorganismengruppen nach Flieg und Pfaff in Nährlösung eine besonders hohe Empfindlichkeit gegenüber 2,4 D zeigen, die anscheinend derjenigen der dikotylen Pflanzen gleichkommt und bei 0,00001 % noch deutlich in Erscheinung tritt. Es darf aber wohl jetzt schon gefolgert werden, daß die 2,4 D für die meisten Bakterien keine Wuchsstoffeigenschaften besitzt, sondern auf diese lediglich eine Giftwirkung ausübt. Bei der praktischen Anwendung der 2,4 D ist eine dauernde Schädigung der untersuchten Arten von Bodenbakterien kaum anzunehmen, da selbst mehrfache Passagen von Bakterienstämmen über 2,4 D-haltige Nährböden nur in vereinzelten Fällen zu einer Steigerung der 2,4 D-Wirkung führten. Geringere, kurzfristige Schädigungen einer Anzahl von Bodenorganismen (bis zum Abbau der 2,4 D) sind in den oberen Bodenschichten nicht ausgeschlossen, weil dort die Konzentrationen bei bestimmten Wetterbedingungen im Bereich von 0,1 bis 0,01 % liegen können. Ob sich jedoch solche zeitlich begrenzten Schädigungen der Bakterienflora auch auf das Pflanzenwachstum auswirken werden, bedarf ebenfalls noch weiterer Untersuchungen.

## Zusammenfassung

Die Empfindlichkeit von Bodenbakterien gegenüber dem Natriumsalz der 2,4 Dichlorphenoxyessigsäure wurde bestimmt durch:

a) Messung der Wachstumsintensität,
b) Keimzahlbestimmungen in Erde und
c) Beeinflussung biochemischer Leistungen, wie Gelatineverflüssigung, Nitratreduktion, Säurebildung, Stickstoffbindung und $CO_2$-Produktion.

Die Wirkung des Wuchsstoffes beginnt im Konzentrationsbereich von 0,01 % bis 0,1 %. Zu den relativ stark empfindlichen Arten sind vor allem die Vertreter der spezifischen Zellulosezersetzer zu zählen, die in die Gattun-

gen *Sporocytophaga* und *Cellvibrio* gehören, dann folgen alle von uns untersuchten Sporenbildner, einerlei ob es sich um Aerobier oder Anaerobier handelt, während eine Reihe von nichtsporenbildenden Bakterien, wie *Azotobacter chroococcum, Azotomonas insolita, Pseud. fluorescens, Pseud. pyocyanea, Bact. prodigiosum,* sich selbst gegen höhere Dosen von 2,4 D als recht unempfindlich erwiesen haben.

Bei praktischer Anwendung von 2,4 D ist eine kurzfristige Schädigung der Bakterienflora in den oberen Bodenschichten nicht ausgeschlossen.

## Literaturverzeichnis


Carlyle, R. E. and Thorpe, I. D.: Some effects of ammonium and sodium 2,4 Dichlorophenoxyacetates on Legumes and the Rhizobium bacteria. — Amer. Soc. Agron. J. **39**, 929, 1947.

Culler, D. M.: The effect of 2,4 Dichlorophenoxyacetate upon the morphological and physiological characteristics of certain microorganisms associated with food spoilage. M. S. thesis, Ohio State University, zit. n. Newman, 1946.

Dubos, R. I.: Inhibition of bacterial growth by auxins. — Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **63**, 317, 1946.

Flieg, O. und Pfaff, C.: Über Wanderung und Abbau der 2,4 D im Boden sowie ihren Einfluß auf mikrobiologische Umsetzungen. — Landw. Forsch. **3**, Heft 2, 113—123, 1951.

Fults, I. L. and Payne, M. G.: Some effects of 2,4 D, DDT and Colorado 9 on the bacteria Rhizobium leguminosarum Frank in the root nodules of the common bean. — Amer. Journ. Bot. **34**, 245, 1947.

Kloke, E.: Einfluß von Pflanzenschutzmitteln auf Bodenorganismen und Pflanzenwachstum. — Vortrag gehalten anläßlich der Tagung der Deutschen Bodenkundl. Gesellsch., Kiel 10. 9. 1951; (vergleiche auch: Kurz und bündig, Jahrg. 4, 1951).

Lewis, R. W. and Hamner, C. L.: The effect of 2,4 D on some microorganisms. — Mich. Agr. Exp. Sta. Quart. Bul. **29**, 112, 1946, zit. n. Newman.

Martin, I. P.: The hormone weed killer 2,4 D. — Calif. Citrograph **31**, 248, 1946, zit. n. Newman.

Newman, A. S.: The effect of certain plant growth-regulators on soil microorganisms and microbial processes. — Soil. Sci. Soc. Proc. **12**, 217, 1947.

Payne, M. G. and Fults, I. L.: Some effects of 2,4 D, DDT and Colorade 9 on root nodulation in the common bean. — Amer. Soc. Agron. J. **39**, 52, 1947.

Smith, N. R., Dawson, V. T. and Wenzel, M. E.: The effect of certain herbicides on soil microorganisms. — Soil Sci. Soc. Amer. Proc. **10**, 197, 1945, zit. n. Newman.

Stapp, C. und Freter, R.: Untersuchungen über die Wirkung von 2,4 D im Boden. I. Mitlg.: Eine verbesserte Nachweismethode und orientierende Versuche über die Haltbarkeitsdauer des Wuchsstoffes im Boden. — Phytopath. Zeitschr. **18**, 365—375, 1951.

Stevenson, E. C. and Mitchell, I. W.: Bacteriostatic and bactericidal properties of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid. — Science, **101**, 642, 1945.

*Aus dem Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung*
*(Erwin-Baur-Institut),*
*Institut für Bastfaserforschung, Niedermarsberg/Westfalen*

# Zur pathologischen Anatomie des Leins, *Linum usitatissimum* L.

Von

W. Rüdiger

*Mit 10 Abbildungen*

Die pilzparasitären Erkrankungen des Leins sind in den Leinbau treibenden Ländern, vor allem in Groß-Britannien, den USA, Rußland und Deutschland schon vielfach Gegenstand der Forschung gewesen (für Deutschland vgl. Rost, 11). Wir kennen heute als wichtigste Erreger von Leinkrankheiten *Melampsora lini* Tul., Leinrost, *Fusarium lini* Boll., den Erreger der Welkekrankheit, *Colletotrichum lini* Manns et Boll., das die Brennfleckenkrankheit oder Anthraknose hervorruft, *Polyspora lini* Laff., die Ursache des Stengelbruchs und der Bräune, die durch *Phoma* und *Ascochyta*-Arten erzeugten Pustelkrankheiten und schließlich noch *Septoria linicola* Speg. (= *Sphaerella linorum*) als Erreger der Leinpest. Daneben treten gelegentlich noch wirtschaftlich unbedeutende Schäden durch den Grauschimmel *Botrytis cinerea* Pers. und — bei hoher Luftfeuchtigkeit — durch ein *Oidium* auf. Die Pathogenität der Schwärzepilze (*Alternaria*- und *Cladosporium*-Arten) ist dagegen noch unsicher. Vielleicht sind diese nicht so harmlos, wie meist angenommen wird. Es gibt immerhin zu denken, daß Ruschmann und Bartram (13) *Alternaria tenuis* Nees als großen Schädling an Leinengarnen feststellen konnten, welcher Cellulose und Pektin gleich stark anzugreifen vermag. Wegener und Questel (19) geben an, daß neben den Schwärzepilzen auch *Fusarium*- und *Phoma*-Arten schon mehrfach als Schädlinge auf Textilien festgestellt worden sind. Es sei in diesem Zusammenhang auch auf die eingehenden Untersuchungen von Marsh und Mitarbeitern (7) über diese Frage hingewiesen.

Während die bisherigen Untersuchungen an Leinkrankheiten sich vorwiegend auf die Feststellung des äußeren Schadbildes und die Erforschung der Lebensweise der Parasiten und der Infektionsbedingungen erstreckten, blieb die anatomische Seite meist unberücksichtigt. Einige orientierende Angaben finden sich bei Pethybridge und Mitarbeitern (10). Für *Melampsora* und *Colletotrichum* liegen außerdem die Untersuchungen Toblers (17, 18), Sharvelles (15) und Schillings (14) vor.

## Material und Methodik

Unsere Untersuchungen bezogen sich in der Hauptsache auf Erkrankungen durch *Polyspora, Phoma* und *Colletotrichum.* In kleinerem Umfange wurden noch *Fusarium* und ein *Oidium* mit herangezogen. Erkrankte Pflanzen wurden in verschiedenen Altersstadien gesammelt und bis zur Untersuchung trocken oder in Alkohol-Glyzerin aufbewahrt. Es wurden Quer- und Längsschnitte angefertigt und mit den üblichen Reagenzien gefärbt. Für besondere Studien wurden Reinkulturen einiger Pilze auf Möhrensaftagar angelegt. Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung der parasitären Wirkung der Pilze auf das Pflanzengewebe ergibt sich aus dem Umstand, daß in der Natur oft Mischinfektionen vorliegen und man mit einiger Wahrscheinlichkeit mehr als einen Schädling auf der gleichen Leinpflanze antreffen wird. Besonders häufig findet man die von uns untersuchten Pilzarten vergesellschaftet, zu denen fast immer noch Schwärzepilze treten. Eine Reininfektion mit einem einzigen Pilz kann meist nur unter künstlichen Bedingungen zustande kommen. Da uns anfangs die Voraussetzungen für derartige Versuche fehlten, waren wir zunächst gezwungen, aus dem anfallenden Freilandmaterial solche Pflanzenteile auszuwählen, die wenigstens einen der Pilze in weit überwiegendem Maße aufwiesen, und uns auf die Stellen der Pflanze zu beschränken, an denen das Pilzmyzel eindeutig zur Bildung der leicht zu bestimmenden Sporen schritt.

Die verschiedenen Formen des parasitären Verhältnisses zwischen Pilz und Wirtspflanze sind bei Fischer und Gäumann (4, 5) ausführlich beschrieben. Hier werden auch die Möglichkeiten des Eindringens von Pilzen in den Wirt erörtert. Dazu ist in Bezug auf die von uns untersuchten Pilze zu sagen, daß schon zahlreiche Infektionsversuche bewiesen haben, daß bei manchen eine Infektion direkt durch die Blattepidermis möglich ist. Dies trifft vor allem für Blatterkrankungen wie *Colletotrichum* zu. Andererseits gelingen Infektionen von Stengelparasiten durch Besprühen der Blätter mit Sporensuspensionen meist nicht. So hatte bei *Phoma* eine künstliche Infektion durch Besprühen erst dann Erfolg, nachdem die Wachsschicht von den Blättern teilweise abgekratzt worden war (Rüdiger, 12). Die Cuticula übt hier zusammen mit der Wachsschicht eine Schutzwirkung aus. Die natürliche Infektion scheint hauptsächlich durch Eindringen der Pilze an verletzten Stellen der Oberhaut vor sich zu gehen (vgl. Baldacci, 1), die sich in Form von mechanischen Beschädigungen und Insektenfraßstellen fast auf jedem Leinstengel finden. Bekanntlich bestehen auch Unterschiede im Verhalten der Parasiten bei der Infektion: Während die Hyphen mancher Pilze durch die Spaltöffnungen eindringen, keimen die Sporen anderer auf der Blattoberfläche nicht zu langen Hyphen aus. Diese Pilze sind also auf unmittelbares Durchstoßen der Epidermis angewiesen. Das Verhalten der einzelnen Leinparasiten in dieser Beziehung ist nicht Gegenstand unserer Untersuchungen gewesen.

Mitunter findet auch eine Infektion von Kapseln statt, die äußerlich völlig intakt bleiben und sich allenfalls etwas dunkler färben. Da in diesen

Fällen meist auch der Fruchtstiel verfärbt ist, wäre an eine Infektion an ihm oder aber an ein Eindringen des Parasiten durch die beim Abbrechen der vertrocknenden Kelchblätter entstehenden Wundstellen zu denken. Zwischen diesen Kelchblattresten und der heranwachsenden Kapsel hält sich auch am längsten etwas Feuchtigkeit, so daß für das Auskeimen von Pilzsporen ein günstiges Mikroklima geboten wird. Von hier aus könnte ein Vordringen des Myzels nach oben hin zur Kapsel und nach unten zum Fruchtstielchen hin die beschriebene Erscheinung hervorrufen.

## *Phoma*-Arten

*Phoma* verursacht eine Allgemeinerkrankung der Pflanze, die sich einmal durch Ablösung der Rinde und weiter in Wachstumshemmungen manifestiert, so daß die Stengel schließlich vorzeitig absterben. Am Stengelgrunde sind die Sporenbehälter des Pilzes (Pyknidien) als zahlreiche, kleine schwarze Pusteln zu erkennen. Über das Auftreten dieser Pilze, ihre Verbreitung und ihre gelegentliche Vergesellschaftung mit *Polyspora lini* und Blasenfüßen (Thrips) wurde schon früher berichtet (12).

Die Erzielung geeigneter Querschnitte durch stark von *Phoma* befallene Pflanzen stößt insofern auf Schwierigkeiten, als durch die Tätigkeit des Pilzes der Zusammenhalt zwischen Rinde und Holzkörper derart gelockert wird, daß die Rinde schon bei leiser Berührung sich ablöst, insbesondere aber beim Schneiden mit dem Rasiermesser. Zur Untersuchung sind also nur schwächer befallene Pflanzen geeignet. Sie zeigen eine Durchdringung des Rindenparenchyms mit dem Myzel des Pilzes, die von Gelb- oder Braunfärbung des Gewebes begleitet ist. Der Pilz wächst in diesem inter- oder intrazellulär und greift nach der Zerstörung des Parenchyms von hier aus nach dem Siebteil und auch zum Holz über, wobei dieses aber nur selten in Mitleidenschaft gezogen wird. Eine Tracheomykose liegt also augenscheinlich

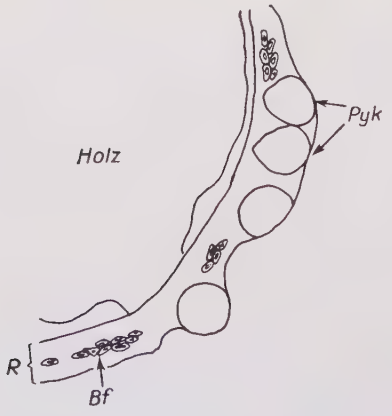



Abb. 1. Querschnitt durch die Rinde eines *phoma*kranken Leinstengels bei schwacher Vergrößerung. Pyk unreife Pyknidien. R Rinde. Bf Bastfasern

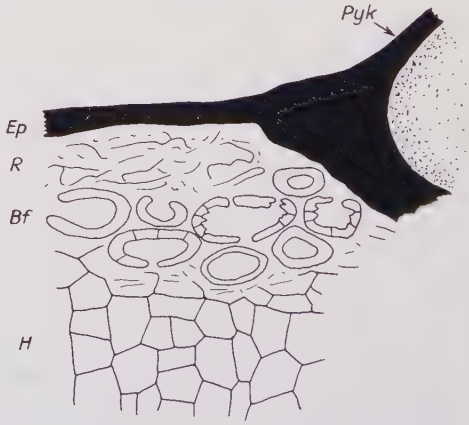



Abb. 2. Dasselbe, Teilausschnitt bei stärkerer Vergrößerung. Ep Epidermis, Bf Bastfasern, H Holzteil, Pyk Pyknidium, R Rinde. Erklärung im Text

nicht vor. Im Rindenparenchym bilden sich auch die Pyknidien (Abb. 1: Pyk.), die bei ihrem Heranwachsen schließlich die Epidermis sprengen. Die Bastfasern kommen an diesen Stellen nicht zur Ausbildung oder werden frühzeitig zerstört. Anderswo bestehen die Bastbündel nur aus verhältnismäßig wenigen Zellen, die recht dünnwandig bleiben. Bald nach der Zerstörung der Parenchymzellen verfallen die Faserwände ebenfalls der Auflösung durch die Enzyme des Pilzes. Man kann hierbei alle Übergänge von noch intakten Fasern bis zu weitgehend zerstörten Formen finden (Abb. 2). Als erste Anzeichen der Zerstörung zeigen sich radiale Risse in der Zellwand. In der Längsansicht bemerkt man, daß besonders die Stellen der „Querelemente" in den Faserwänden erste Angriffspunkte für die Schadwirkung des Pilzes darstellen. Diese von Lüdtke (6) nachgewiesenen Bauelemente der Faserzellwand, die weder Cellulose noch Lignin enthalten, werden anscheinend durch die Pilzenzyme leichter aufgelöst als die andere Wandsubstanz. Es findet demnach keine gleichmäßige Abtragung der Zellwand, sondern eine lokalisierte Auflösung statt, die schließlich zur Durchlöcherung und zum Zerbrechen der Wand führt. Als Endstadium der Zerstörung bemerkt man eine homogene, verquollene, braune Masse, in der dann auch die Zellen des Parasiten zugrunde gehen. Im Querschnitt sind die Pilzhyphen meist schwer zu verfolgen, doch konnte in Längsschnitten mehrmals beobachtet werden, daß die Hyphen im Innern der Fasern entlang krochen. Sowohl bei dem Angriff auf das Parenchym als auch bei der Schädigung der Faserzellen erfolgt zuerst eine Auflösung der Mittellamellen, die durch das Ausbleiben der Färbung mit Rutheniumrot nachgewiesen werden kann.

Aus der Zerstörung des Parenchyms, das die Bastfasern mit Nährstoffen versorgt, und aus dem Entzug der Nährstoffe durch das Pilzmyzel erklärt sich sowohl die Dünnwandigkeit der Faserzellen als auch die Ablösung der Rindenschicht vom Holz. Da auch der Siebteil zerstört wird, und vermutlich sogar die „Infektionsschiene" bildet, auf der das Myzel im Stengel entlang wächst, hat dies bei schwerem Befall das Absterben der ganzen Pflanze zur Folge. Hierbei zeigt sich oft ein Vorauseilen der abtötenden Wirkung vor dem weiter wuchernden Pilzmyzel.

Die Frage, ob es sich immer um eine Infektion durch *Phoma lini* Pass. handelt oder ob es noch andere *Phoma*-Arten als Leinparasiten gibt, wie es den Anschein hat (11), bedarf noch weiterer Klärung und ist wahrscheinlich vor einer systematischen Neuordnung der Gattung *Phoma* nicht zu entscheiden. Nach Angaben von Nicklovà (8) wurde an dem früheren Standort unseres Instituts in Nordmähren auf einem Teil des dort verbliebenen Leinsortiments neben *Phoma lini* Pass. auch *Phoma exigua* Desm. festgestellt, für die ein etwas anderes äußeres Schadbild beschrieben wird.

*Phoma* wird durch die in den Pyknidien gebildeten Sporen verbreitet. Neben der Anhäufung dieser Sporenbehälter am Stengelgrunde erscheinen diese auch hin und wieder auf Samen. Hierbei kommt es aber anscheinend zu keiner Zerstörung der tieferen Schichten der Samenschale, da der Pilz nur die oberste Schicht (Schleimepidermis) befällt. Eine Beizung der Leinsaat mit fungiziden Mitteln erscheint demnach aussichtsreich.

## *Polyspora lini* Laff.

Beim Befall mit *Polyspora* treten im typischen Falle über den ganzen Stengel verteilt längliche braune Flecken auf, die bei stärkerer Erkrankung etwas eingesenkt erscheinen und den Stengel umgreifen. Diese „Bräune" führt zur Notreife und dadurch zum Ausfall ganzer Nester in einem Flachsfeld. Die Einsenkungen treten besonders am Stengelgrunde auf. Durch Umknicken fällt ihnen schließlich der ganze Stengel zum Opfer (Stengelbruch, stem break).

Nach der Röste löst sich die Faser an den eingesenkten Stellen nur schwer vom Holz, ein Zeichen dafür, daß die pektinvergärenden Bakterien hier nicht angreifen und den Zellverband lockern konnten. Es sei hier schon vorweggenommen, daß die gleiche Erscheinung beim Befall mit *Colletotrichum* und *Melampsora* auftritt.

Die Infektion erfolgt wahrscheinlich hauptsächlich durch Verletzungen der Keimblätter. Untersucht man eine Befallsstelle mikroskopisch, so findet man je nach der Stärke des Angriffs eine mehr oder weniger tiefgreifende Nekrose des Gewebes. Hierbei treten neben Verkümmerungen einzelner Gewebsteile auch hypertrophische Entartungen auf, so daß der Stengelquerschnitt eine unregelmäßige Form mit exzentrischer Ausbildung des Holzkörpers annimmt. Die Rinde ist weitgehend obliteriert, ihre Parenchymzellen sind zusammengedrückt und braun verfärbt. An Stelle ihres Inhaltes sind teilweise Pilzhyphen getreten, die Bastfasern sind völlig entartet. Voneinander getrennte Faserbündel sind nicht zu erkennen, die Faserzellen liegen in einem kontinuierlichen Ring in mehr oder weniger lockerem Verband über den ganzen Querschnitt verteilt (Abb. 3, 4). Ihre Form ist tangential verzerrt, ihre Größe variiert von kleinen Kümmerformen bis zu riesigen hypertrophischen und dünnwandigen Zylindern, die in fast regelmäßiger Wiederkehr das eintönige Bild des kontinuierlichen Bastringes unterbrechen können. Vielfach treten auch Hohlräume (Lochnekrosen) auf (Abb. 4), die, falls sie in der Rinde liegen, bald nach außen durchbrechen und dann derartig bizarre Bilder wie Abbildung 5 liefern. Hierbei sieht man bisweilen

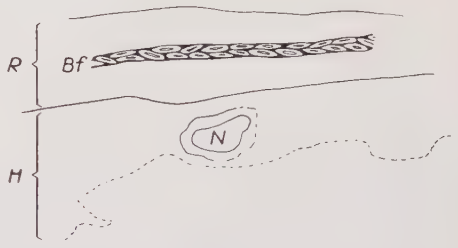



Abb. 3. Querschnitt durch die Rinde eines von *Polyspora* befallenen Leinstengels. Bf Bastfasern, H Holzteil, N Nekrotischer Hohlraum (im Holz), R Rinde

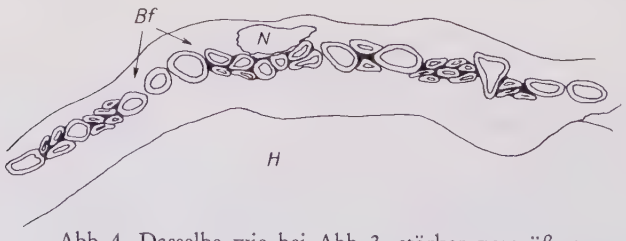



Abb. 4. Dasselbe wie bei Abb. 3, stärker vergrößert. Erklärung im Text

deutlich, wie sich die einzelnen Schichten der Faserwand voneinander lösen. Der Zwischenraum zwischen den Faserzellen ist oft von einer homogenen gelb-braunen Masse ausgefüllt. Abb. 3 zeigt eine Lochnekrose im Holzkörper, der bis zu der gestrichelten Linie unter der Einwirkung des Pilzes steht und dunkelbraun gefärbt erscheint. Mitunter kann eine derartige Nekrose durch den Holzkörper hindurch bis in das Mark vordringen. In solchen Fällen treten dann die erwähnten Deformationen der Stengel auf. Diese Erscheinung findet man fast stets am Stengelgrund. Da die Pflanze durch die Nekrose teilweise ihres Festigungsgewebes beraubt wird, ist dies dann die Ursache des Stengelbruches. Auch hier bemerkt man oft das schon bei *Phoma* erwähnte Vorauseilen der vergiftenden Wirkung. Die Wand der Faserzellen läßt sich durch Phloroglucin-Salzsäure stark anfärben. Die Affinität gegen Farbstoffe ist an den nekrotischen Stellen stärker als im gesunden Gewebe. Besondere Sporenlager des Pilzes treten nicht auf. Er vermehrt sich durch Abschnürung von Konidien an Hyphen, die die Epidermis nach außen durchbrechen.

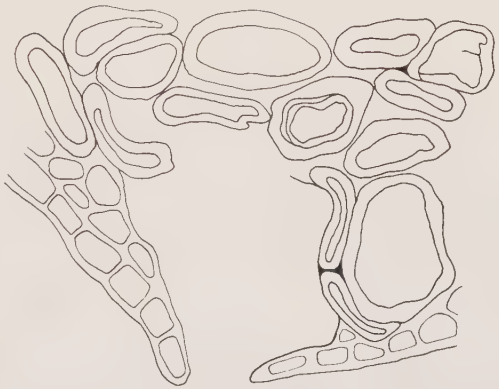


Abb. 5. Lochnekrose in der Rinde mit Durchbruch nach außen und entartete Bastfasern, durch *Polyspora* verursacht

Während *Phoma* sich nur selten in den Kapseln findet, werden diese von *Polyspora* häufig angegriffen. Beim Befall der Kapseln ist zu berücksichtigen, daß die Gewebeanordnung hier eine andere ist als im Stengel. Bastfasern fehlen völlig, dagegen treten sklerenchymatische Zellen anderer Art und verkieselte Zellen in Erscheinung. Die Ligninausrüstung der Mittellamelle ist im allgemeinen bei reifen Kapseln stärker als in anderen Teilen der Pflanze. Infolge dieser größeren Festigkeit der Kapselwand sind die durch Pilze verursachten Nekrosen nicht so augenfällig und äußern sich nur in einer allgemeinen Dunkelfärbung der Kapseln. Im Innern findet man bei stark befallenen Kapseln aber oft eine völlige Zerstörung ihres Inhaltes, so daß sie schließlich nur noch ein aus Zelltrümmern und Pilzsporen bestehendes Pulver enthalten, in dem sich in einzelnen Fällen noch wenige flache und sterile Samen befinden. Bei stärkerem Befall kann also ein erheblicher Verlust an Leinsamen auftreten. Ist die Erkrankung noch nicht so weit vorgeschritten, so findet man Kapselwand und Septen stark mit Myzel überwachsen, das auch die reifenden Samen befällt und ihnen ihren natürlichen Glanz raubt. *Polyspora* vermag die Schichten der Samenschale zu durchwachsen und sogar den Embryo zu erreichen, bei schwachem Befall haftet der Pilz nur oberflächlich der Schleimepidermis an.

## *Colletotrichum lini* Manns et Boll.

Dieser Pilz erzeugt die Brennfleckenkrankheit des Leins, eine der häufigsten Erkrankungen der Keimpflanzen. Kennzeichnend sind die blasig-hellbraunen Flecken auf den Keimblättern und Faulstellen an den jungen Stengeln und am Wurzelhals. Auf ihnen findet man die Sporenlager des Pilzes. Die Blattnekrosen sind bereits von SCHILLING (12) beschrieben und abgebildet worden. Während der Befall der Keimblätter die Pflanze zunächst noch nicht abtötet, obwohl ihre Fähigkeit zur Assimilation durch die Nekrosen beeinträchtigt wird, bilden die Faulstellen an Wurzelhals und Stengel die Ursache des Umfallens und Absterbens der Pflänzchen. An Querschnitten durch solche Stellen bemerkt man eine Verbreiterung des Rindengewebes, in dem sich nur vereinzelt Bastfasern finden, die sehr entfernt voneinander liegen. Nach SCHILLING ist die Keimpflanze, die sofort bei der Keimung von der Samenschale her infiziert wird, intra- und extrazellulär vom Myzel durchwachsen. Die orangefarbenen Flecken an Hypokotyl und Wurzel sind auf Desorganisation der befallenen Zellen zurückzuführen, die in eine glasige gelbe Masse verwandelt werden. Die Cellulose-Reaktion dieser Zellreste ist negativ, die Reaktion mit Phloroglucin-Salzsäure mitunter positiv. Verdickungen oberhalb dieser Flecke beruhen auf Hypertrophie des parenchymatischen Grundgewebes. Der Befall älterer Pflanzen und das Vordringen bis zur Kapsel soll durch stufenweise Infektion erfolgen. Nach SCHILLING kommt *Colletotrichum* nur in der Schleimschicht des Samens vor, nicht aber in den tieferen Schichten.

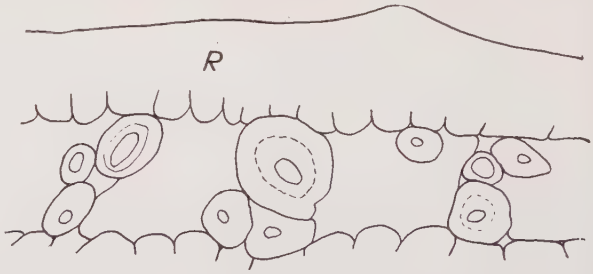



Abb. 6. Entartung von Bastfasern und Zerstörung des Rindenparenchyms unter dem Einfluß von *Colletotrichum lini*

An befallenen älteren Stengeln zeigen sich Veränderungen im Rindengewebe, das dunkelbraun gefärbt ist. Besonders stark wird die Bastfaserschicht und der Siebteil befallen. Die Bastfasern sind meist dünnwandiger, größer und viel weniger zahlreich als bei gesunden Pflanzen. Bündel werden nicht ausgebildet. Das zwischen den Fasern liegende Parenchym ist oft zerstört, so daß die Faserzellen im leeren Raum liegen und nur in radialer Richtung durch das Nachbargewebe gestützt werden (Abb. 6). Stark hypertrophierte Faserzellen fallen gelegentlich zusammen und hinterlassen dann große Hohlräume (Abb. 7). Die Faserzellen werden schließlich in eine dunkelgelbe, glasige, homogene Masse verwandelt,

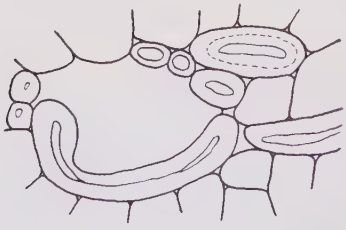


Abb. 7. Entstehung eines Hohlraumes durch Zusammenfallen einer hypertrophisch aufgeblähten Bastfaserzelle

die keinerlei Strukturen mehr erkennen läßt. Infolge der starken Durchwucherung des Siebteils mit Myzel wird auch der äußerste Rand des Holzteils etwas angegriffen und erscheint braun verfärbt. Tiefer greifende Nekrosen des Holzteils wurden jedoch nicht beobachtet. Befallene Kapseln zeigen das gleiche Bild wie bei *Polyspora*.

### *Melampsora lini* Tul.

Wegen ihrer eigenartigen Sonderstellung seien anschließend noch kurz die Verhältnisse beim Befall durch den Leinrost besprochen, wie sie von Tobler (14, 15) beschrieben worden sind. Die orange-gelben Uredo-Sporenlager des Pilzes auf Stengeln und Blättern sind schon aus einiger Entfernung zu erkennen. Bei älteren Pflanzen und in vorgerückter Jahreszeit entwickeln sich schwarze Krusten, welche die Teleuto-Sporenlager des Pilzes darstellen. Die Infektion erfolgt durch die Spaltöffnungen. Bei diesem Pilz zeigt sich wieder ein deutlicher Angriff auf die Faserwand, der so stark ist, daß die Zellen vollständig zerstört werden können (Abb. 8). Das Rindengewebe der Umgebung wächst hypertrophisch zu Riesenzellen aus (Abb. 9), über denen

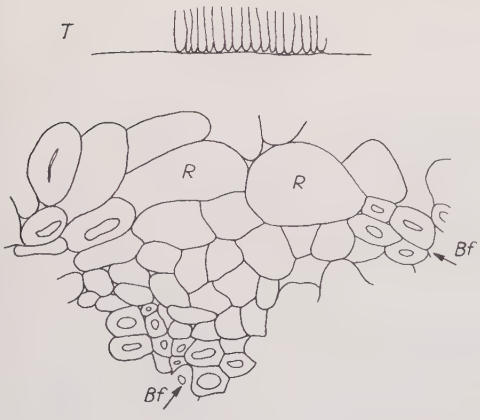



Abb. 8. Riesenzellen des Rindenparenchyms und deformierte Faserbündel aus einem rostkranken Leinstengel. Bf Bastfasern, R Rindenzellen, T Teleutosporenlager des Pilzes. Nach Tobler

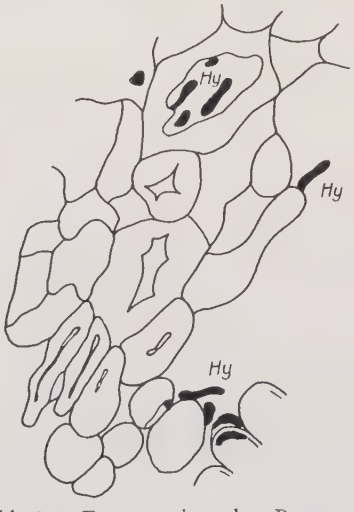



Abb. 9. Degeneration der Bastfasern im rostkranken Leinstengel. Hy Hyphenteile des Pilzes. Nach Tobler

palisadenartig angeordnet die Initialzellen des Teleuto-Sporenlagers liegen (T). Die anatomischen Bilder können recht verschiedenartig sein. Der Wirkungsgrad des Pilzes kann von einem mehr oder weniger einflußlosen Wuchern im Rindengewebe bis zum Auflockern der Bastbündel oder gar zur Zerstörung der Bastzellen durch Auflösung ihrer Membranen fortschreiten. Bei äußerlich schwachem Befall kann es doch zu einer starken Schädigung der Bastfasern kommen, die sich dann hauptsächlich in geringer Festigkeit des Fasergutes äußern. Hinzu kommt die oben erwähnte, durch den Pilz

verursachte „Imprägnierung" des Rindengewebes gegen pektinzerstörende Bakterien, die eine einheitliche Röste der befallenen Stengel verhindert und so das Stroh minderwertig macht.

Auch SHARVELLE (15) befaßte sich mit der Empfänglichkeit des Leins gegen Rost und untersuchte die Ausbreitung des Parasiten innerhalb der Gewebe, in denen es sogar zur Bildung von Uredosporen kommen soll, wie ja auch die Teleutosporen bei *Melampsora lini* immer subepidermal angelegt werden. Die Dicke der Epidermis, der Zustand und die Zahl der Spaltöffnungen und die Ernährung haben u. a. großen Einfluß auf die Empfänglichkeit der Pflanze gegen den Pilz. Bei wenig empfänglichen Sorten findet man oft auch eine dickere Cuticula- und eine kollenchymatische hypodermale Zellschicht, so daß der Eindruck einer zweischichtigen Epidermis entsteht.

### *Fusarium lini* Boll.

*Fusarium lini* ist ebenfalls schon mehrfach Gegenstand von Untersuchungen gewesen (BROADFOOT 2 und TISDALE 16). Es tritt in unseren Breiten seltener auf, da der Pilz zu seiner Entwicklung ein Temperaturoptimum von 28 ° C erfordert. Daneben kommt auch *Fusarium avenaceum* Sacc. als Leinparasit vor. Durch diese Erreger werden meist das Wurzelsystem und der Stengelgrund besonders bei jungen Pflanzen beschädigt. An diesen Stellen finden sich dann auch die rosafarbenen Sporenlager des Pilzes mit ihren charakteristischen Sichelsporen.

Die Schädigung durch diese Pilze führt zu Welkeerscheinungen und beruht auf einer Lahmlegung des Leitungssystems der Pflanze. Nach TISDALE (16) dringen die Pilze von den Wurzelhaaren her durch das Rindenparenchym bis zu den Gefäßbündeln vor, worauf die Pflanzen gewöhnlich durch Toxinwirkung eingehen. Die Spaltöffnungen sind bei welkekranken Pflanzen fast immer geschlossen und unbeweglich (SHARVELLE, 15), da die Schließzellen absterben. Nach unseren Beobachtungen wird das Gewebe einschließlich der Bastfasern bei starkem Befall völlig aufgelöst. An Stelle dessen fanden wir eine Unmenge im Schleim gebetteter Mikrokonidien. Der Holzkörper zeigte insofern Veränderungen, als er durch einen vom Pilzmyzel erzeugten roten Farbstoff angefärbt erscheint. Ähnlich wie bei *Phoma* ließen sich auch hier die einzelnen Stadien der Korrosion der Bastfasern feststellen.

Weiterhin wurde die Wirkung eines nicht näher bestimmten *Oidiums* auf die Leinpflanze untersucht. Dieser Pilz verursacht eine Blatterkrankung, welche mit nekrotischen, entfärbten Zellgruppen im Mesophyll beginnt und zum Vergilben und Absterben der Blätter führt. Befallene Stengel zeigten nur eine oberflächliche Schädigung der Epidermis, von der einzelne Zellen mit einer körnigen Masse erfüllt waren. Tiefer greifende Wirkungen des Pilzes wurden nicht beobachtet, gelegentlich allerdings eine Stauchung und Verkümmerung der Triebspitze.

Die nachstehende Tabelle gibt eine Übersicht über die wichtigsten mikrochemischen Reaktionen der von den genannten Pilzen befallenen Gewebe. Aus ihr geht hervor, daß besonders die stärkere Ligninablagerung in den

Wänden der Bastfaserzellen ins Auge fällt. Auch die nekrotischen Stellen im Rindenparenchym sind meist stark verholzt. Aus dem Ausbleiben der Färbung mit Rutheniumrot ist der Abbau des Pektins der Mittellamellen an diesen Stellen deutlich erkennbar. Die verhältnismäßig geringfügigen Veränderungen durch *Colletotrichum* erklären sich wohl dadurch, daß die untersuchten Pflanzen wesentlich jünger waren als die von den anderen Pilzen befallenen und der Angriff des Pilzes auf den Stengel nicht so heftig ist wie auf die Blätter.

*Tabelle 1*

Farbreaktionen der von den untersuchten Pilzen angegriffenen Gewebe

| Reagens | *Phoma* | *Polyspora* | *Colletotrichum* | *Melampsora* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Uredoform | Teleutoform |
| Verfärbung ohne Reagens | Holz unverändert, Bastfaser gelbbraun, Rinde braun | Holz unverändert braun Bastf. gelbbraun Rinde braun | Holz unverändert, Bastf. gelbbraun, Rinde braun | Holz unverändert, Bastf. ± unveränd. | Holz unverändert, Bastf. unverändert dunkelbraun, Rinde dunkelbraun |
| Safranin | Holz rot Bastf. rosa | Holz rot Ep. + Nekrosen rot Bastf. braungelb bis rot | Holz rot Bastf. ungef. | Holz rot Ep. rosa Bastf. ungefärbt | Holz rot Rinde z. T. rot, Bastf. rot |
| Phlorogluzin-HCl | Holz rot Bastf. rot | Holz rot Bastf. ± rotgelb, sek. Rinde teilw. rot | Holz rot Bastf. ungef. | Holz rot Ep. teilw. rot Bf. ungefärbt | Holz rot Ep. + Rinde rot, Bastf. a. d. Innenseite d. Bündel rot, sonst gelb |
| Mäulerakt. | Holz rot | Holz rot | Holz rot Bastf. ungef. | Holz rot Bf. ungefärbt | Holz rot Bf. ungefärbt |
| Rutheniumrot | keine Färbg. an nekrot. Stellen | keine Färb. an nekrot. Stellen u. an gelblich verfärbten Bastf. Hypertrophien positiv | normale Reaktion, stellenweise jedoch fehlend | normale Reaktion | normale Reaktion |
| Millons Reagens | Nekrosen schwach gelblich | Nekrosen dunkelgelb bis braun | ungefärbt | ungefärbt | ungefärbt |
| Chlorzinkjod | hypertroph. Bastf. viol. | Bastf. ± braunviol.-gelbbraun Holz braun | Bastfasern violett, Holz gelblich | Bf. hellblau | Bf. gelbbraun |

Zu diesen, für die Leinstroh verarbeitende Praxis wichtigen, weil wertmindernden Beschädigungen tritt noch eine Verringerung der Fertilität befallener Pflanzen durch die Schwächung ihrer Lebenskraft oder durch direkten Befall der Kapseln. Dieser kurze Hinweis möge genügen, um die wirtschaftliche Bedeutung der leinparasitischen Pilze zu beleuchten. Es wäre überflüssig, an dieser Stelle die Wichtigkeit der Züchtung pilzresistenter Sorten noch besonders betonen zu wollen. Von einer Erörterung des Resistenzproblems und der damit zusammenhängenden Fragen soll hier auch schon deswegen Abstand genommen werden, weil an unserem Institut von anderer Seite her auf diesem Gebiet gearbeitet wird.

## Kulturversuche mit verschiedenen celluloseabbauenden Pilzen

Im Nachstehenden seien noch die Ergebnisse einiger Versuche gebracht, die zeigen sollten, welche Formen der Cellulose und welche anderen Membranstoffe die Leinparasiten angreifen und abbauen können. Diese Untersuchungen hatten nicht zum Ziel, den Chemismus des Celluloseabbaus oder auch nur die Art der Einwirkung auf die technische Faser im einzelnen aufzuklären. Hierfür liegen bereits die eingehenden Arbeiten von RUSCHMANN und BARTRAM (13), MARSH (7) und neuerdings die Untersuchungen von WEGENER und QUESTEL (19) vor. Es sollte von uns lediglich geprüft werden, ob die leinparasitären Pilze imstande sind, in zuckerfreien Medien Cellulose sowohl im nativen als auch im aufbereiteten Zustand anzugreifen und ob sie mit diesen Stoffen als einziger Kohlenhydratquelle leben können, und ferner, ob sie andere Membranstoffe ebenso abzubauen vermögen. Nach dem Vorgang OTTOS (9) wurden den Pilzen folgende Substanzen geboten:

native Cellulose aus Baumwolle,
native Cellulose aus Leinfasern (Röstflachs),
Oxycellulose aus Leinen, hergestellt mit 0,25 bis 0,5 % $KMnO_4$-Lösung + Nachbehandlung mit ½ bis 1 % NaOH,
Hydratcellulose aus Leinen, hergestellt durch stufenweise Behandlung mit Alkohol, Äther, verd. Schwefelsäure und Natronlauge,
Hemicellulosen aus Dattelendosperm (Schnitte),
verholzte Membranen, als Lindenholz (Schnitte),
verholzte Membranen als Flachsscheben,
verkorkte Membranen als Schnitte durch Flaschenkork.

Geprüft wurde mit folgenden Leinparasiten: *Fusarium lini, Polyspora lini, Phoma lini, Colletotrichum lini* und *Alternaria tenuis.* Ferner wurde noch das gelegentlich als Schwächeparasit auf Lein auftretende *Trichothecium roseum* Link. berücksichtigt.

Die Membranstoffe wurden den Pilzen in Richardscher Nährlösung geboten (10 g $KNO_3$, 5 g $KH_2PO_4$, 2,5 g $MgSO_4$ und eine Spur $FeCl_3$ pro Liter dest. Wasser), aus der die Glukosekomponente weggelassen worden war. Das pH der Lösung betrug 4,6.

Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Wirkung der Pilze nach durchschnittlich vier Wochen.

*Tabelle 2*

| gebotene Substanz | *Fusarium* | *Polyspora* | *Phoma* | *Colletotrichum* | *Alternaria* | *Trichothecium* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| nat. Cell. aus Baumwolle | Die Fasern zeigen Korrosion durch Risse | | | | | |
| nat. Cell. aus Röstflachs | Die Fasern zeigen starke Korrosion. Erst Auflösung des Zellverbandes durch Abbau der Mittellamellen, dann Angriff auf die Einzelfaser (Risse, Verschmierung der Zellwand, die Fasern erscheinen angenagt) | | | | | |
| Oxycellulose | Korrosion | schwache Korrosion | starke Korrosion | | | schwache Korr., reichl. Sporenbildg. |
| Hydratcellulose | Korrosion | keine Korrosion | schwache Korrosion | Korrosion | sehr starke Korrosion | keine Korr. |
| Hemicellulosen | überall völliger Abbau durch Auflösen der Mittellamellen und Verquellung der Membran, reichliche Myzel- und Sporenbildung | | | | | |
| Lindenholz | Mittellam. angegriffen, Rotfärbung | intakt | intakt | intakt | intakt | intakt |
| Flachsscheben | schwache Korr., Sporenbildung, Rotfärbung | Korrosion | schwache Korrosion, reichliche Sporenbildung | | | starke Korr. |
| Kork | Beginn der Korrosion | leichte Korrosion | Korrosion | unversehrt | Korrosion | starke Korr. |

Aus diesen Befunden geht hervor, daß alle diese Pilze in der Lage sind, die verschiedenen Cellulosepräparate abzubauen, wenn auch in verschiedenem Grade. Eine Untersuchung nach weiteren zwei Wochen ergab ein rasches Fortschreiten der Zerstörung. Besonders drastisch war die Wirkung bei *Alternaria*, bei welcher der Abbau der Cellulosen am raschesten vor sich ging. Daß die Parasiten im Leinstengel optimale Bedingungen für ihr Gedeihen vorfinden, erhellt aus dem Umstand, daß Leinstengel-Querschnitte von allen Pilzen besonders heftig angegriffen wurden, so daß die Rinde einschließlich der Bastfasern in kurzer Zeit aufgelöst war. Der Abbau der Fasern sei an dem Beispiel von *Fusarium* etwas eingehender geschildert. Nachdem die Mittellamellen aufgelöst sind, erfolgt der Angriff auf die Faserwand, die alsbald schleimig verquillt. An einzelnen Fasern kann man die Auflösung durch schräge Einrisse oder grubige Vertiefungen in der Zellwand

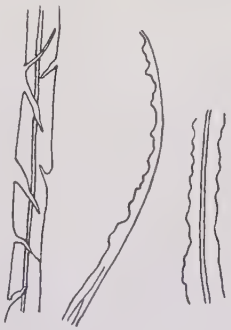


Abb. 10. Korrosion der Faserwand unter dem Einfluß von Enzymen von *Fusarium lini*

gut beobachten (Abb. 10). Diese Erscheinungen werden anscheinend weniger durch den direkten Angriff der Pilzhyphen auf die Wandsubstanz bewirkt als durch die Wirkung der vom Pilz ausgeschiedenen Enzyme. Hierfür spricht auch, daß andere Mikroorganismen, z. B. Bakterien, ähnliche Erscheinungen hervorrufen. Nach LÜDTKE (6) werden die Baustoffe der pflanzlichen Zellwand im Jugendstadium leichter durch Enzyme aufgelöst als später.

Die Angriffe auf Holz- und Korksubstanz sind weniger heftig und schreiten langsamer vorwärts. Intakt bleiben auch diese Substanzen bei längerer Einwirkung nicht. So ergab eine Prüfung nach drei Monaten bei allen Pilzen einen mehr oder weniger deutlichen Abbau der Zellwände.

## Zusammenfassung

Wenn wir rückblickend die vielfältigen Veränderungen betrachten, welche durch die besprochenen Pilze an der Leinpflanze hervorgerufen werden, so können wir die folgenden gemeinsamen Züge in den histologischen und mikrochemischen Veränderungen herausstellen:

1. Das Rindenparenchym wird meist völlig zerstört, ebenso der Siebteil.
2. Veränderungen der Bastfasern erfolgen einmal durch Hypertrophie und nachträgliches Zusammenfallen ganzer Zellen, zum anderen durch Korrosion der Zellwände unter dem Einfluß der Enzyme der Pilze.
3. Veränderungen des Holzes äußern sich in Verfärbung, Hypertrophie einzelner Teile des Holzkörpers und Korrosion.
4. Im erkrankten Gewebe bilden sich braungelbe oder rote Farbstoffe.
5. Die abtötende Wirkung eilt dem Wachstum des Pilzmyzels oft voraus.
6. Kulturversuche zeigten, daß die beschriebenen Pilze in der Lage sind, verschiedene Celluloseformen, Pektine, Holz- und Korksubstanz, enzymatisch abzubauen.

## Literaturverzeichnis

1. BALDACCI, E., La resistenza delle piante alle malettie. Genua 1942.
2. BROADFOOT, W. C., Studies on the parasitism of Fusarium lini Boll. Phytopathology **16**, 1926, 951.
3. EGLITIS, M., Beitrag zur Mikroflora der Leinpflanze von leinmüdem Boden. Contrib. Baltic Univ. Nr. 12, 1947.
4. FISCHER, E. und E. GÄUMANN, Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. 1929.
5. GÄUMANN, E., Pflanzliche Infektionslehre. 1946.
6. LÜDTKE, M., Neuere Ergebnisse der Zellwandforschung und ihrer Bedeutung für phytopathologische Fragen. Phytopath. Ztschr. **3**, 1931, 341.
7. MARSH, P. B., K. BOLLENBACHER, M. L. BUTLER und K. B. RAPER, The fungi concerned in fiber deterioration. II. Their ability to compose cellulose. Text. Res. Journ. **19**, 1949, 462.
8. NICKLOVÁ-NAVRATOLOVÁ, H., Usychani lnu. Ochrana rostlin **22**, 1949, 121.

9. Otto, H., Untersuchungen über die Auflösung von Cellulose und Zellwänden durch Pilze. Beitr. z. allg. Bot. (G. Haberlandt) **1**, 1916, 190.

10. Pethybridge, G. H., H. A. Lafferty und J. G. Rhynehart, Studies on the diseases of flax. Journ. Dept. agric. a. techn. Instr. f. Ireland **21**, 1921, 167.

11. Rost, H., Untersuchungen über einige Krankheiten des Leins in Deutschland. Angew. Bot. **20**, 1938, 412.

12. Rüdiger, W., Untersuchungen über die Pustelkrankheit des Leins *(Phoma lini)*. Beitr. z. Agrarwiss. **2**, 1948, 3.

13. Ruschmann, G. und H. Bartram, Weitere Untersuchungen über den Verderb von Flachsfasern und Leinengarnen durch bakterielle und pilzliche Schädlinge. Die Bastfaser **3**, 1943, 29.

14. Schilling, E., Bemerkungen über eine durch *Gloeosporium lini* verursachte Flachskrankheit. Faserforschung **2**, 1922.

15. Sharvelle, E. G., The nature of resistance of flax to *Melampsora lini*. Journ. Agric. Research **53**, 1936, 81.

16. Tisdale, W. H., Flax wilt, a study of the nature and inheritance of wilt resistance. Journ. Agric. Research **11**, 1917, 573.

17. Tobler, F., Zur Kenntnis der Lebens- und Wirkungsweise des Flachsrostes. Faserforschung **1**, 1921, 223.

18. — —, Flachsrost und Bastfaser. Faserforschung **15**, 1941, 132.

19. Wegener, W. und R. Questel, Untersuchungen über die Ursache der Zerstörung von nativen Faserstoffen durch Mikroorganismen. Melliand Textilber. **32**, 1951, 346 und 493.

# Untersuchungen über die Wirkungen von hochmolekularen organischen Stoffen als Spritzmittel gegen Rostpilzinfektion*)

Von

H. Fürst

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung einer neuen Gruppe von chemischen Verbindungen zur Bekämpfung von Rostpilzen untersucht.

Es hat bisher nicht an Bemühungen gefehlt, chemische Mittel gegen verschiedene Rostkrankheiten zu verwenden. G. Gassner und K. Hassebrauk (3) prüften 1936 eine große Reihe organisch-chemischer Verbindungen, darunter Acridin, Brom-naphthol, $\alpha$-Naphthol und Pikrinsäure gegen Rost auf Weizen und Gerste. Die Verfasser stellten die damals bekannte Literatur zusammen. K. Hassebrauk (8, 9) setzte die Arbeiten fort und fand u. a. Trinitrotoluol, 4-Amido-diphenylamin-2-sulfonsaures Natrium und p-Toluolsulfonamid als prophylaktisch wirksam, wenn er die Präparate wie bei einer Kopfdüngung im Felde auf die Bodenoberfläche ausstreute. Diese Anwendungsmethode hat gegenüber der Spritzung besondere Vorteile, sie erscheint bei der Behandlung der Kulturpflanzen rentabler. H. Hart und J. L. Allison (7) bestätigten die genannten Versuchsergebnisse ebenso wie W. Straib (18), der die gleichen fungizid wirksamen Stoffe prüfte. K. Hassebrauk (10) beschäftigte sich mit der Prüfung der Wirksamkeit kupferhaltiger Spritzmittel gegen den Spargelrost. Der gleiche Verfasser beschrieb vor kurzem (11) die rosthemmende Wirkung der in der Human- und Veterinärmedizin verwendeten Sulfonamide und Sulfone bei Getreidekeimpflanzen.

In den genannten Arbeiten wurde eine Vielzahl von organisch-chemischen Verbindungen untersucht, die hauptsächlich zum Bestand der älteren organischen Chemie gehören. Seit kurzer Zeit sind in der organischen Chemie die sogenannten quaternären Ammonverbindungen bekannt geworden, die unter dem Namen „Invertseifen“ in die Literatur eingegangen sind (19). Sie

*) Die in der vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Untersuchungen sind in den Jahren 1943—1944 im Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig durchgeführt, konnten aber aus kriegs- und nachkriegsbedingten Gründen bisher nicht veröffentlicht werden.

Die biologische Prüfung der vom Verfasser hergestellten Präparate erfolgte in der damaligen Zweigstelle Braunschweig-Gliesmarode der Biologischen Reichsanstalt. Sie lag in den Händen des im Kriege gefallenen Reg.-Rat Dr. Straib, dem ich für seine Unterstützung zu Dank verpflichtet bin.

leiten sich hauptsächlich von organischen Stickstoffbasen ab und sind durch das Vorhandensein eines oder mehrerer langer Alkylreste gekennzeichnet. Viele derartige Verbindungen lassen sich kurz durch die allgemeine Formel

$$\left[R-(N^{-})\right]^{(+)}X^{(-)}$$

darstellen, worin der Stickstoff direkt mit Alkyl-, Aryl- und gemischten Resten verbunden sein kann oder Bestandteil einer heterocyclischen Gruppe ist, R eine meist lineare, lange Kohlenwasserstoffkette (Alkyl = $C_8$ — $C_{18}$) ist und $X^{(-)}$ einen Säurerest darstellt. Diese Verbindungen besitzen alle starke bakterizide Wirkung (19) und werden im letzten Jahrzehnt in zunehmendem Maß als Desinfektionsmittel benutzt (2, 16).

Die Literatur über die Verwendung der genannten Verbindungen als f u n g i z i d e Mittel hatte zur Zeit der Inangriffnahme der eigenen Untersuchungen (1943) noch geringen Umfang. Chloriertes Lauryl-pyridinium-sulfat wirkt nach einem deutschen Patent (1) insektizid und fungizid zugleich, und Rigler und Greathouse (17) beschrieben Chinolinhomologe und -derivate, die fungizid wirken. J. C. Lo Cicero und Mitarbeiter (14) nannten noch einige neuere Literaturstellen, die sich mit der Verwendung dieser Verbindungen als Fungizide beschäftigen und untersuchten selbst substituierte langkettige Pyridinium-halogenide in ihrer Wirkung gegen Konidien und Sporen verschiedener Pilze.

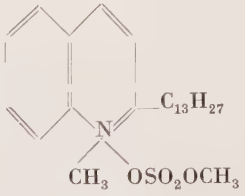
Die hochmolekularen Alkylheterocyclen erfüllen die für Fungizide allgemein erhobene Forderung der Unschädlichkeit für Mensch und Tier. Miller und Baker (15) wiesen experimentell ihre relative Ungiftigkeit und bakterizide Wirkung bei innerer Anwendung nach. Sie werden in der Humanmedizin als unschädliche Desinfektionsmittel benutzt (8). In USA werden die Invertseifen als sogenannte „Quats“ in Brauereien zur Reinigung und Desinfektion verwendet.

In Vorversuchen wurden 2-Alkylverbindungen von Pyridin und Chinolin als N-Methyl-Methosulfate benutzt, die im Organisch-Chemischen Institut entwickelt worden waren. Von den unten genannten Präparaten schieden einige wegen starker phytotoxischer Wirkung aus, andere waren nur schwach fungizid.

Auf die Darstellung der verwendeten quaternären 2-Alkyl-heterocyclischen Verbindungen soll an dieser Stelle nicht eingegangen werden. Es wurden mehrere Homologe aus dieser Reihe dargestellt:

N-Methyl-2-heptyl-pyridinium-methosulfat,
N-Methyl-2-tridecyl-pyridinium-methosulfat,
N-Methyl-2-heptadecyl-pyridinium-methosulfat,
N-Methyl-2-heptyl-chinolinium-methosulfat,
N-Methyl-2-tridecyl-chinolinium-methosulfat,
N-Methyl-2-heptadecyl-chinolinium-methosulfat,
N-Methyl-(8-oxychinolinium-dodecyläther)-methosulfat.

Die niedrigen Glieder dieser Reihe sind Öle, während die höheren Alkylverbindungen wachsweiche, teilweise kristallisierte Substanzen darstellen. Sie sind in Wasser löslich, die Lösungen der höheren Glieder schäumen stark und haben alle gut netzende Eigenschaften. In der Lösung herrscht durch die Hydrolyse der Methosulfate saure Reaktion (pH = 2,5). Bei Zusatz von Alkali über den Neutralpunkt flockt die bereits im sauren Gebiet im kolloiden Zustand vorliegende N-Methylbase aus.




Von den genannten Verbindungen erwies sich in den Vorversuchen das N-Methyl-tridecyl-chinolinium-methosulfat als besonders geeignet. Es verhinderte in wäßrigen Spritzmitteln in Konzentrationen von 0,25 bis 0,10 % das Zustandekommen der Infektion an Versuchspflanzen mit *Uromyces phaseoli, Puccinia menthae, P. antirrhini* und den Getreiderosten *Puccinia glumarum* und *Puccinia triticina* sowie mit *Melampsora lini*, wenn die Spritzung vor dem Impfen oder dem Befall erfolgte. Wie bereits erwähnt, gestaltete die phytotoxische Wirkung der Verbindungen den chemotherapeutischen Index der Stoffe ungünstig. Die Verbrennungen der Pflanzen waren bei den gegen Rostpilze wirksamen Konzentrationen derart stark, daß die reinen Verbindungen in Lösung nicht brauchbar waren.

Es wurde nun versucht, den Stoffen durch ungiftige Zusätze ihre Verbrennungswirkung auf die Pflanze zu nehmen. Zunächst war an eine Abpufferung zu denken, die mit Natriumacetat auf den pH-Wert = 7 vorgenommen wurde. Aber sie bewirkte nur noch stärkere Schädigung der Pflanzen. Bei dieser pH-Zahl liegen offenbar stärkere Konzentrationen der wirksamen N-Methylbasen der Verbindungen vor, die auch stärker pflanzenschädigend wirken.

Durch Zusatz von handelsüblicher Sulfitablauge (bzw. einer 8- bis 10-prozentigen Lösung von Zellpechpulver), der zunächst zur Erhöhung der Haftfähigkeit erfolgte, wurde überraschenderweise die Verbrennungswirkung der Methosulfatlösungen aufgehoben. Verwendet man Sulfitablauge aus der Zellstoffherstellung, die in gereinigter Form pH = 7 besitzt, in Mischung mit den Mittellösungen, so gelangt man zu Spritzmitteln, in denen salzartige Komplexverbindungen der Ligninsulfonsäure der Ablauge mit den quaternären Ammoniumverbindungen in kolloider Form vorliegen. Zweckmäßig verwendet man höhere Konzentrationen an Ablauge, da in niedrigen die Komplexverbindungen ausflocken, so daß die Lösung nicht mehr spritzbar ist, und die Netzwirkung des Methosulfates zurückgeht. Bei hohem Gehalt an Sulfitablauge erfolgt eine Ausflockung erst nach Zugabe von Alkali, wie bei den reinen Methosulfatlösungen.

Bei der Prüfung der Wirkung der Komplexverbindungen war die Frage zu klären, welchen Einfluß Sulfitablauge allein auf die Rostinfektion ausübt. Für die Entwicklung verschiedener anderer pilzlicher Erreger ist ihre fördernde Wirkung bekannt, wovon man sich z. B. für *Penicillium glaucum* durch einen Kulturversuch mit Sulfitablauge-Agar leicht überzeugen kann. Greis (4) konnte erst kürzlich bei *Rosellinia reticulospora Gr.* einen keimungsfördernden Einfluß durch Zusatz von Sulfitablauge zum Nähragar feststellen. Ältere Versuche, Sulfitablauge für sich oder nach Behandlung mit Chlor bzw. Schwefelwasserstoff im Pflanzenschutz nutzbar zu machen, hatten bisher keine praktischen Ergebnisse (5). Es war also nicht vorauszusehen, daß Sulfitablauge allein die Keimung der Uredosporen verschiedener Rostarten *(Uromyces phaseoli, Puccinia menthae, P. antirrhini, P. asparagi, P. triticina, P. glumarum, Melampsora lini* usw.) und ebenso das Zustandekommen der Infektion größtenteils verhinderte bzw. bei schwachem Befall stark hemmte, wobei zwischen den einzelnen Rostarten graduelle Unterschiede erkennbar waren[1]) Dabei tritt in keinem Falle eine merkliche Schädigung der Pflanzen und ihres Wachstums durch Spritzungen mit Sulfitablauge im Gewächshaus ein. Störend wirkte nur die Verschmierung der Blätter, wodurch die Pflanzen unansehnlich wurden, was bei der Spritzung von Zierpflanzen, z. B. von Löwenmaul, gegen Rost zu beachten wäre.

Die Wirkung der Sulfitablauge auf die Rostpilzinfektion ist offenbar spezifisch, denn gegenüber Getreidemehltau *(Erysiphe graminis tritici* und *E. graminis hordei)* blieb Sulfitablauge wirkungslos; sie verhinderte weder die Keimung der Konidien noch merklich das Zustandekommen der Infektion, wie durch mehrere Versuchsreihen nachgewiesen werden konnte.

Die kolloiden Sulfitablauge-Methosulfatlösungen waren allerdings gegenüber den verschiedenen Rostarten bedeutend wirksamer als Sulfitablauge allein. Auch verdünnte Lösungen der angewandten Mittel, z. B. von N-Methyl-tridecyl-pyridin-Methosulfat bei Gegenwart von genügend Sulfitablauge zur Bildung einer Komplexverbindung zeigten gute prophylaktische Wirkung gegen die Infektion mit verschiedenen Rostarten. Um ein zu starkes Verschmieren der Pflanzen zu verhindern, wurde der Anteil der Sulfitablauge in den Lösungen bis auf 20 % herabgesetzt, ohne daß Verbrennungen entstanden. Bei 10 % machten sich die ersten Verbrennungen bemerkbar, besonders bei Bohnen, weniger bei Getreide.

Zur Veranschaulichung des Wirkungsgrades dieser Substanzen seien die Ergebnisse je einer Prüfungsreihe mit *Puccinia antirrhini* und *P. triticina* genannt. Die Versuche wurden bei 15 bis 20 ° C im Gewächshaus durchgeführt (Tabelle 1). Die Spritzung wurde 24 Stunden vor dem Impfen der Versuchspflanzen vorgenommen.

[1]) Die Wirkung von Sulfitablauge bzw. Zellpechpulvern verschiedener Herkunft kann geringe Schwankungen aufweisen.

*Tabelle 1*

Beeinflussung des Befalls mit *Pucc. antirrhini* und *Pucc. triticina* durch Spritzlösungen

| | *Pucc. anthirrhini* | | *Pucc. triticina* | |
|---|---|---|---|---|
| | Keimprozent der Uredosporen | Befallsstärke: Pustelzahl je Versuchspflanze | Keimprozent der Uredosporen | Befallsstärke |
| Sulfitablauge 8 % . . . | 0 | 5 | 0 | (+) |
| Sulfitablauge 4 % , . . | 0 | 15 | 0 | + |
| Pyr.-$C_{13}$-Methos.-Sulfitabl. 8 %ig = 0.25 %ige Lösung | 0 | 1 | 0 | 0—(+) |
| Pyr.-$C_{13}$-Methos.-Sulfitabl. 4 %ig = 0.25 %ige Lösung | 0 | 1 | 0 | (+) |
| Zellpechpulver verstäubt . | vac. | 20 | vac. | ++++ |
| Kontrolle unbehandelt . . | 30 | 110 | 90 | +++++ |

Bei *Puccinia antirrhini* auf *Antirrhinum majus* wurde die Pustelzahl von zehn beimpften Pflanzen je Behandlungsart festgestellt und hieraus das Mittel je Pflanze mit durchschnittlich 16 infizierten Blättern berechnet. Für *Puccinia triticina* auf Michigan-Amberweizen (200 Keimpflanzen je Behandlung) war die Zahl der Pusteln bei den unbehandelten Kontrollen verhältnismäßig groß. Der Befall wurde lediglich geschätzt, wobei die Ergebnisse durch Symbole veranschaulicht wurden. Dabei bedeutet (+) wenige Einzelpusteln, + und ++ Einzelpusteln bzw. lockerer Pustelbesatz, +++ entspricht stärkstem Pustelbesatz, während +++ und ++++ entsprechende Zwischenstufen des Befalls symbolisieren.

Spritzungen nach dem Impfen blieben erfolglos, die Versuche wurden deshalb nicht ausgeführt.

Die hier mitgeteilten Ergebnisse wurden in Gewächshausversuchen unter kontrollierten Bedingungen gewonnen. Es lagen aber auch bereits Versuche aus dem Jahre 1943 im Freiland vor, in denen die Komplexverbindungen von N-Methyl-tridecylpyridinium-methosulfat (0,25 %) und Sulfitablauge mit gutem Erfolg zur Bekämpfung des Pfefferminzrostes angewandt wurden. Der Versuch wurde an drei Sorten (Pfälzer Minze und zwei Mitcham-Minzen) in dreifacher Wiederholung bei einer Parzellengröße von 2 qm eingeleitet, als sich der erste Rostausbruch zeigte. Die erste Spritzung erfolgte am 27. August, die zweite am 15. September 1943. Ende September waren die nicht gespritzten Kontrollparzellen, besonders bei Pfälzer Minze und Mitcham-Minze, Herkunft Gommern, schwer rostig und die Blätter fielen ab, während die gespritzten Parzellen frischgrünes Aussehen zeigten und nur schwächeren Rostbefall aufwiesen, wie er zu Beginn der Spritzung bereits vorhanden war. Eine Ausdehnung des Befalls war also hier verhindert worden (vgl. auch Tabelle 2). Dies wirkte sich noch für den Äzidienausbruch im nächsten Frühjahr aus, der auf den gespritzten Parzellen schwächer blieb als auf den unbehandelten.

*Tabelle 2*

Fungizide Wirkung des N-Methyl-tridecylpyridinium-Methosulfats bei *Puccinia menthae*

| Pfefferminzsorte | Stärke des Rostbefalls [1]) *(Puccinia menthae)* 12. 10. 43 | |
|---|---|---|
| | unbehandelt | bespritzt |
| Mitcham-Minze, Herk. Struhk-Gommern | 4.2 | 1.7 |
| Mitcham-Minze, Herk. Lutzenberger-Franzheim | 2.0 | 0.5 |
| Pfälzer-Minze, Herk. Degen-Gommersheim | 5.0 | 2.5 |

[1]) 0 = befallsfrei, 1 = sehr schwacher Befall, 5 = stärkster Befall, 2—4 = entsprechende Zwischenstufen des Befalls.

Ein zweiter, an Stangenbohnen durchgeführter Versuch mit derselben Komplexverbindung führte nicht zu gleich eindeutigen Ergebnissen, da der Rostbefall zur Zeit der Spritzung offenbar schon zu weit vorgeschritten war.

Untersuchungen in der Staatlichen Lehr- und Versuchsanstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau in Veitshöchheim ergaben, daß 0,1prozentige Lösungen von N-Methyl-tridecylchinolin-methosulfat, Sulfitablauge und Haftmittel enthaltend, ausreichende fungizide Wirkung gegen den falschen Mehltau der Rebe *(Peronospora)* zeigten. In den Versuchen auf dem Weinberg wurden das früher vorgeschlagene 8-Oxychinolin bzw. sein N-Methyl-methosulfat zum Vergleich herangezogen, die aber nur mangelhafte Wirkung besaßen.

Bekannte Vergleichsmittel mit guten fungiziden Eigenschaften waren 0,5-prozentige Kupferkalkbrühe und „Vitigran" der ehemaligen I. G. Farben-Industrie. Nach einem Versuchsbericht der Mittelprüfstelle der ehemaligen Biologischen Reichsanstalt in Naumburg/Saale haben Spritzbrühen mit den genannten langkettigen quaternären Ammonverbindungen eine beachtliche Wirkung gegen Rebenperonospora gezeigt. Amtliche Prüfungen der Mittel konnten aus zeitbedingten Gründen nicht mehr durchgeführt werden.

Die angeführten Versuche mit Spritzlösungen können zunächst nur theoretisches Interesse beanspruchen. Sie führten noch nicht zur Verwendung der Mittel in der Praxis, da das Verfahren einer prophylaktischen Spritzung der besprochenen Kulturpflanzen noch unrentabel ist.

Die genannten chemischen Substanzen dringen offenbar in die Blätter ein, selbst dann, wenn die Oberflächenbeschaffenheit, z. B. durch Anwesenheit einer Wachsschicht, ungünstig ist. Demnach scheinen die Forderungen von Gassner und Hassebrauk (3) erfüllt zu sein, daß die Stoffe „in das enge Ernährungsverhältnis von Wirtspflanze und Parasit störend eingreifen", um „dem sich vom Plasma der Wirtspflanze ernährenden Pilz durch diese Nahrungsquelle schädigende Substanzen zuzuführen".

Die Sulfitablauge wie auch die langkettigen wirksamen Glieder der homologen Reihen der genannten heterocyclischen Verbindungen sind Substanzen mit hervorragender Netz- und Schäumwirkung. Es ist bekannt, daß Netzmittel fungizide Wirkung besitzen können. Ältere Beispiele sind die Seifen, die bekanntlich insektizide und fungizide Wirkung besitzen (6), die auf alkalischer Ätzwirkung im Verein mit starker Benetzung der Schädlinge beruhen und vermutlich von der Verstopfung an ihren lebenswichtigen Organen durch Absetzbarkeit der fettsauren Salze in kolloider Form herrühren. Ein neues Beispiel ist in der Veröffentlichung von H. Köhler (12) zu finden, in der die fungizide Wirkung des Netzmittels Dibutylnaphthalin-sulfosaures Natrium zunächst auf Pilzkulturen von *Rhizoctonia solani, Botrytis spec., Mucor spec., Fusarium culmorum* und andere Schadpilze festgestellt wird. Wieweit die Netzwirkung der hochmolekularen quaternären Verbindungen ein Bestandteil ihrer fungiziden Eigenschaften ist, kann noch nicht entschieden werden. Kuhn und Bielig (13) äußern, daß die biologische Wirkung der Invertseifen, zu denen auch die geschilderten Verbindungen gehören, vermutlich mit ihrer Reaktionsfähigkeit mit den Anionen der Zellproteine und den Symplexen, die in Mikroorganismen vorkommen, zusammenhängt.

## Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die 2-Alkylheterocyclen von Pyridin und Chinolin, von denen mehrere Homologe gewonnen und in die quaternären N-Methyl-Methosulfate umgesetzt wurden, erwiesen sich gegenüber verschiedenen Rostpilzen wirksam und verhinderten die Keimung der Uredosporen sowie das Zustandekommen der Infektion.

2. Für sich allein lassen sich diese Stoffe nicht anwenden, da sie starke Verbrennungen an den Pflanzen hervorrufen. Durch Zusatz von Sulfitablauge wird die Verbrennungswirkung aufgehoben.

3. Auch Sulfitablauge allein erwies sich gegenüber verschiedenen Rostarten prophylaktisch wirksam, doch ist die Wirkung weitaus geringer als bei den Komplexverbindungen, die durch Umsetzung mit den erwähnten quaternären Methosulfaten entstehen. Diese orientierenden Versuche wurden im Gewächshaus vorgenommen.

4. Durch Spritzen mit der Komplexverbindung von N-Methyl-tridecyl-pyridinium-methosulfat (0,25 %) und Sulfitablauge gelang es im Freiland, den Rostbefall der Pfefferminze stark herabzudrücken.

5. Die gleichen Verbindungen erwiesen sich gegen den falschen Mehltau der Weinrebe *(Peronospora)* wirksam.

## Literaturverzeichnis


1. Böhme Fettchemie G.m.b.H. in Chemnitz. Fungizide und insektizide Mittel. Deutsches Reichspatent 693 827 vom 20. Juni 1940, angemeldet 19. April 1936.
2. Bückmann, H., Über Invertseifen, Fette und Seifen **48**, 759, 1941.
3. Gassner, G. und Hassebrauk, K., Untersuchungen zur Frage der Getreiderostbekämpfung mit chemischen Mitteln. Phytopath. Zeitschr. **9**, 427, 1936.
4. Greis, H. und Greis-Dengler, J., Zur Biologie und Entwicklungsgeschichte von *Rosselli-nia reticulospora* nov. Spec. Jahrbuch für wissenschaftliche Botanik **89**, 341, 1940.
5. Handbuch der Pflanzenkrankheiten (Berlin 1939) VI. Band, 1. Halbband, S. 537—38.
6. ibid. S. 528.
7. Hart, H. and Allison, J. L., Toluene compounds to control plant disease. Phytopathology **29**, 978, 1939. Ref. Zeitschr. f. Pflanzenkrankh. **52**, 288, 1942.
8. Hassebrauk, K., Beiträge zur chemischen Bekämpfung von Rost auf Kulturpflanzen. Angewandte Botanik **20**, 366, 1938.
9. — —, Weitere Untersuchungen über Getreiderostbekämpfung mit chemischen Mitteln. Phytopath. Zeitschr. **11**, 212, 1938.
10. — —, Zur Frage der Verwendung kupferhaltiger Spritzmittel im Kampf gegen den Spargelrost. Phytopath. Zeitschr. **14**, 76, 1942.
11. — —, Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. Phytopath. Zeitschr. **17**, 384, 1951.
12. Köhler, H., Dibutyl-naphthalin-sulfosaures Natrium, ein neues Fungizid. Nachrichtenblatt für den Deutschen Pflanzenschutzdienst **5**, 145, 1951.
13. Kuhn, R. und Bielig, H. J., Über Invertseifen I; Die Einwirkung von Invertseifen auf Eiweißstoffe. Ber. d. Deutschen Chemischen Gesellschaft **73**, 1080, 1940.
14. Lo Cicero, J. C. und Mitarbeiter. Die Beziehung zwischen chemischer Struktur und fungizider Wirkung in einer Reihe substituierter und unsubstituierter Pyridiniumhalide. Journal of Biologic Chemistry **172**, 689, 1948.
15. Miller und Baker. Hemmung des Bakterienstoffwechsels durch synthetische Reinigungsmittel. Science **91**, 624, 1940.
16. Ridenour, G. M. und Armbruster, E. H., Einige Faktoren, die die Eigenschaften von quartären Ammoniumverbindungen als Desinfizientien beeinflussen. American Journal of Public Health **38**, 505, 1948.
17. Rigler, N. E. und Greathouse, G. A., Fungicidal Potency of Quinoline Homologs and Derivatives. Against Phymatotrichum omnivorum. Ind. engineer. chem. ind. edit. **33**, 693, 1941.
18. Straib, W., Über die Wirkung organischer Verbindungen als Spritzmittel gegen Rostpilzinfektion. Zentralblatt für Bakteriologie, II. Abteil. **103**, 73, 1941.
19. Westphal, O. und Jerchel, D., Invertseifen. Kolloid-Zeitschrift **101**, 213, 1942.

*Aus dem Institut für physiologische Botanik*
*der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Braunschweig*

# Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste

## III. Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Sulfonamiden und Sulfonen

Von

K. Hassebrauk

*Mit 1 Abbildung*

Inhalt: 1. Einleitung und Fragestellung — 2. Untersuchungen über den Antagonismus zwischen Sulfonamiden und p-Aminobenzoesäure — a) Versuche mit *Puccinia triticina* — b) Versuche mit *P. simplex* und *P. coronata* — 3. Untersuchungen über den Antagonismus zwischen einem Sulfon und p-Aminobenzoesäure — 4. Untersuchungen über die rosthemmende Wirkung von Estern der p-Aminobenzoesäure und von p-Aminosalicylsäure — 5. Untersuchungen über die Wirkung von p-Aminobenzoesäure auf das Rostverhalten — 6. Versuche mit Pikrinsäure und p-Aminobenzoesäure — 7. Besprechung der Ergebnisse — 8. Zusammenfassung — 9. Literaturverzeichnis.

### 1. Einleitung und Fragestellung

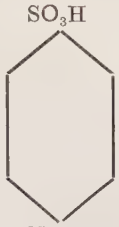
Nach der für die Humanmedizin so bedeutungsvollen Entwicklung der Sulfonamide durch Domagk, Mietzsch und Klarer (14) sowie Tréfouel, Tréfouel, Nitti und Bovet (69) setzte eine Flut von Untersuchungen ein, die darauf abzielten, den Mechanismus der bakteriostatischen Wirksamkeit dieser Substanzen zu klären. Die in diesen Untersuchungen schrittweise gewonnenen Erkenntnisse prinzipieller Bedeutung waren folgende:

Stamp (64) konnte 1939 aus Streptococcenkulturen ein Agens isolieren, das in verschiedenen Medien eine antagonistische Wirkung gegenüber Sulfonamiden ausübte. Stamp spricht wohl als erster die Vermutung aus, daß sich die Wirkung der Sulfonamide möglicherweise gegen eine Substanz von der Art eines Co-Enzyms richte, die mit jenem antagonistisch wirkenden Stoffe zu einem Enzymsystem gekoppelt sei. Die kurz darauf von Woods (76) und Woods und Fildes (77) gewonnene Feststellung, daß p-Aminobenzoesäure (PAB) in vitro gleichfalls einen starken antisulfonamidischen Effekt ausübt, legte die Annahme nahe, daß der zunächst mit Vitamin H' bezeichnete Antagonist der Sulfonamide mit PAB identisch sei, die als ein Bakterienwuchsstoff von größter Wirksamkeit erkannt wurde (Rubbo und Gillespie, 58; Möller und Schwarz,52). Diese Hypothese fand sich bestätigt, als es dann nahezu gleichzeitig, aber unabhängig voneinander, Rubbo und Gillespie (58),

Kuhn und Schwarz (39) sowie Blanchard (7) gelang, PAB aus Hefe zu isolieren (vgl. auch Ratner und Mitarbeiter, 56, sowie Lampen und Mitarbeiter, 40).

Im Hinblick auf die strukturelle Ähnlichkeit, die zwischen der PAB und der p-Aminobenzolsulfosäure besteht,

p-Aminobenzoesäure



p-Aminobenzolsulfosäure

entwickelte Fildes (19) folgende Vorstellung von dem Mechanismus der Sulfonamidwirkung: Die Sulfanilsäure verdrängt die PAB von irgendeinem Rezeptor, zu dem sie dank ihrer strukturellen Ähnlichkeit die gleiche Affinität aufweist. In Verbindung mit der PAB liefert dieser Rezeptor einen für den Organismus lebensnotwendigen, in Verbindung mit der Sulfonsäure einen physiologisch unwirksamen Symplex (vgl. Kuhn, 36).

Viele Arbeiten, in denen an den verschiedensten Objekten, Bakterien, Strahlenpilzen, Flagellaten, Algen (Grün- und Kieselalgen), Pilzen und höheren Pflanzen, der Antagonismus zwischen PAB und Sulfonamiden nachgewiesen werden konnte, haben diese Hypothese weitgehend gestützt.

Im Verlaufe der weiteren Untersuchungen ergab sich, daß die PAB in überraschender Vielfältigkeit offenbar an zahlreichen biosynthetischen Prozessen beteiligt ist, so an der Bildung der außerordentlich wirksamen Folinsäure, an der Entstehung mancher Aminosäuren, Nukleinsäuren u. a. m., so daß vielfach durch die Endprodukte ein ähnlicher antisulfonamidischer Effekt erzielt werden kann wie durch die PAB (Auhagen, 3, 4; Lampen und Jones, 41; Schopfer, 60; Schopfer und Anker, 61; Tschesche, 70; Tschesche und Cremer-Bartels, 71, u. a.). Wenn infolgedessen auch die Ansichten über den eigentlichen Angriffspunkt der Sulfonamide teilweise auseinandergingen (vgl. auch die Reducton-Theorie: Forrest und Walker, 20; Bell, Cocker und O'Meara, 6; Tschesche, Loop und Soehring, 72), so ändert das nichts an der exakt bewiesenen Tatsache, daß sich die Sulfonamidwirkung auf dem Wege einer Verdrängung der PAB vollzieht, die als Wuchsstoff unmittelbar oder als Baustein in der Biosynthese höherer Komplexe mittelbar im Stoffwechsel vieler daraufhin untersuchter Organismen unentbehrlich ist.

Diese Feststellung schließt nicht aus, daß die Sulfonamide daneben auch noch in andere lebenswichtige Prozesse mehr oder weniger tief eingreifen können (vgl. Rudolph, 59). Es ist auch nicht zu übersehen, daß ein therapeutisch durchaus bewährtes Sulfonamid, das Marfanil, einen Antagonismus zu PAB nicht aufweist. Wir dürfen aber dennoch dem in einer großen Anzahl von Fällen eindeutig nachgewiesenen Antagonismus der meisten Sulfonamide

zur PAB den Vorrang bei einer Erklärung der Sulfonamidwirkung einräumen.

Nachdem meine früheren Untersuchungen erbracht hatten, daß sich die Entwicklung von Getreiderosten chemotherapeutisch durch bestimmte Sulfonamide unterbinden läßt (Hassebrauk, 30, 31), wurde die Frage geprüft, ob der erwähnte antagonistische Effekt zwischen Sulfonamiden und PAB auch bei diesem Objekt vorliegt und unter den durch den obligaten Parasitismus der Uredineen erzwungenen Versuchsbedingungen nachzuweisen ist.

## 2. Untersuchungen über den Antagonismus zwischen Sulfonamiden und PAB

### a) Versuche mit *Puccinia triticina*

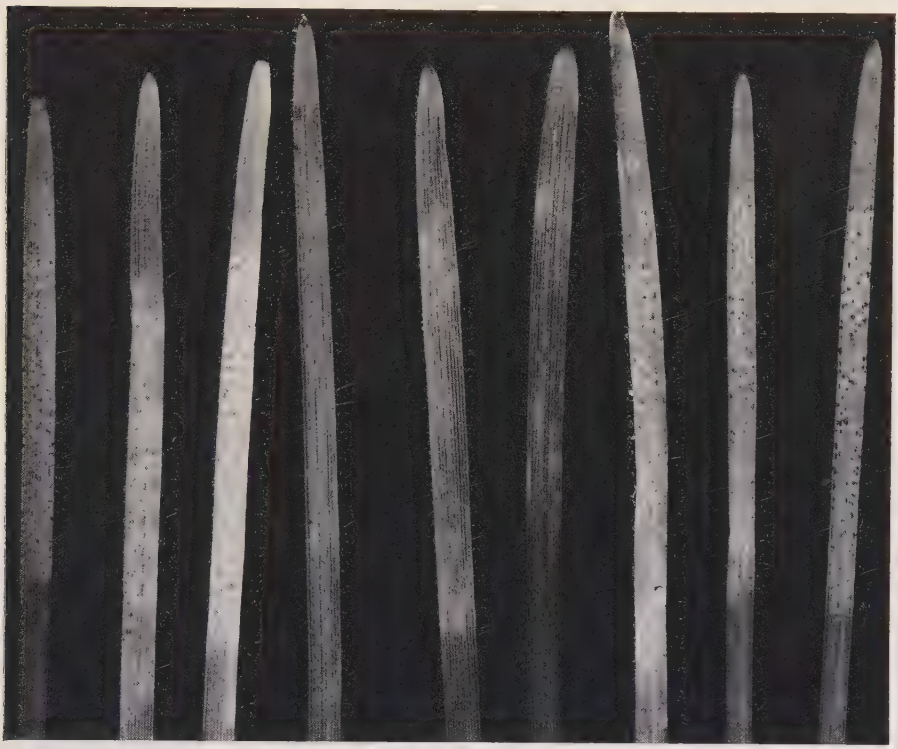
Unter den auf ihre rosthemmende Wirkung untersuchten Sulfonamiden hatte sich in den früheren Versuchen das Ladogal sehr gut bewährt. Wenn auch relativ hohe Aufwandmengen erforderlich sind, den Rostbefall auf Weizenkeimpflanzen zu unterdrücken, so weist es doch — zumindest bei weizenbewohnenden Rostarten — einen günstigen chemotherapeutischen Index auf. Ein Vorzug des Ladogals liegt weiterhin in seiner Wasserlöslichkeit, die eine genaue Dosierung gestattet.

Die Frage, ob sich die rosthemmende Wirkung des Ladogals durch PAB aufheben läßt, wurde in mehreren Versuchsreihen mit *Puccinia triticina* und der hochanfälligen Weizensorte Michigan Amber zunächst nach folgender Methode geprüft: Den in Versuchstöpfen von 8 cm oberen Durchmessers in Anger angezogenen Versuchspflanzen wurde am Tage des Beimpfens, d. h. acht bis zehn Tage nach dem Auslegen, Ladogal in Gaben von 1,5 bis 3,0 g je 100 qcm verabfolgt. Nach 24stündiger Bedeckung unter Glasglocken wurde ein Teil der Versuchspflanzen sodann für drei Nächte hintereinander kopfüber in der a. O. beschriebenen Weise mit den oberirdischen Teilen in wäßrige Lösungen von 0,1 % PAB eingehängt; die Kontrollpflanzen wurden entsprechend in Wasser eingehängt.

Es erübrigt sich, die hierbei im einzelnen erzielten Ergebnisse tabellarisch wiederzugeben. Durch das Ladogal wurde in Übereinstimmung mit den früheren Untersuchungen die Fruktifikation des Rostes völlig unterbunden. Während die Kontrollpflanzen Infektionstypus IV ± aufwiesen, ließen die beimpften Blätter der mit Ladogal behandelten Pflanzen ausnahmslos Typus i-0 erkennen. Von etwa 2,0 g ab war eine geringe Wachstumsverzögerung, bei 2,5 g eine schwache chlorotische Aufhellung der Wuchszone zu bemerken. Durch das Einhängen in PAB wurde die Sulfonamidwirkung völlig aufgehoben; sämtliche beimpften Blätter wiesen nunmehr wie die Kontrollen Infektionstypus IV, zum Teil sogar einen noch stärkeren Pustelausbruch auf (Abb. 1). In zahlreichen Wiederholungen wurde stets das gleiche Resultat erzielt.

Geringe Abänderungen der Methodik wirkten sich auf das Endergebnis nicht aus. So konnte auch noch durch eine 0,03 %ige PAB-Lösung der gleiche Effekt erzielt werden, wenn die Pflanzen am Tage des Beimpfens 1,5 g je 100 qcm Ladogal bekommen hatten.

Abb. 1. Die Aufhebung der rosthemmenden Wirkung von Sulfonamid durch nachträgliche Zufuhr von p-Aminobenzoesäure



Kontrolle | Mit Sulfonamid (Ladogal) gedüngt | Mit Sulfonamid (Ladogal) gedüngt und 24 Stunden nach dem Beimpfen in PAB-Lösung eingehängt

Die Wirkung zeigte sich unabhängig von dem verwendeten Biotyp[1]) oder von der Versuchssorte, gleich welchen Anfälligkeitsverhaltens. Es wurde

[1]) Die Umstellung der Versuche auf einen anderen als den bisher für die Untersuchungen verwendeten Biotyp ergab sich dadurch, daß sich *Darluca filum* sehr stark eingenistet hatte und auch durch vorsichtigstes Überimpfen nicht beseitigt werden konnte. Es ließ sich während der Verseuchung mit *D. filum* mehrmals die bemerkenswerte Feststellung machen, daß der Pilz auch auf solchen beimpften Blättern üppig fruktifizierte, die infolge einer drei Tage vor der Beimpfung vorgenommenen Sulfonamidbehandlung auch bei gewissenhafter Lupendurchmusterung keinerlei Uredobildung, sondern nur Infektionstypus 0 aufwiesen. Nach allen vorliegenden Erfahrungen, die durch eigene Infektionsversuche immer wieder bestätigt werden konnten, vermag sich *D. filum* nicht ohne gleichzeitige Infektion der Wirtspflanze mit einem Rostpilz zu entwickeln, wenn auch die Pykniden im Innern des Blattes auf Kosten des phanerogamen Wirtes angelegt werden können (Hulea, 33). Die Beobachtung berechtigt daher zu der Schlußfolgerung, daß die Infektion mit *P. triticina* trotz der drei Tage vorher durchgeführten Sulfonamidbehandlung immerhin noch zum Haften gekommen ist, daß aber das Rostmycel nicht mehr zur Ausbildung der Sporenlager befähigt ist. Die Ergebnisse sind weiterhin insofern von Interesse, als sie zeigen, daß *D. filum* durch eine Sulfonamidbehandlung der Wirtspflanze nicht an der Weiterentwicklung gehemmt wird.

durch das Einhängen in PAB-Lösung jeweils der Infektionstypus herbeigeführt, den die nicht mit Ladogal behandelten Kontrollen aufwiesen.

Die gleiche Aufhebung der Sulfonamidwirkung durch PAB konnte nach dieser Methode stets erzielt werden, wenn den Versuchspflanzen am Tage des Beimpfens für die Rostunterdrückung ausreichende Mengen Aristamid verabfolgt wurden. In den Fällen, wo die Aristamidgabe nicht zur völligen Unterdrückung des Pustelausbruchs ausreichte, ließ sich wieder mehrfach, wie in den früheren Untersuchungen, die Entstehung goldgelber, an *P. glumarum* erinnernder Uredolager beobachten. Diese goldgelben Uredosporen sind nicht keim- und infektionsfähig.

Um festzustellen, nach welcher Zeitspanne PAB die Sulfonamidwirkung noch aufzuheben vermag, wurde folgender Versuch durchgeführt: Die Versuchspflanzen erhielten am Tage des Beimpfens 2,0 g/100 qcm Ladogal und wurden dann nach 2, 4, 6, 8 und 10 Tagen für drei Nächte in 0,1 %ige PAB-Lösung eingehängt. Nach dieser Methode konnte auch die vier Tage nach der Ladogalbehandlung einsetzende PAB-Zufuhr die Sulfonamidwirkung völlig kompensieren. Bei den nach sechs Tagen in PAB eingehängten Pflanzen blieb die eigentliche Infektionszone in der Folge meist befallsfrei, während sich dem Blattgrunde zu noch reichlich Uredolager bildeten. Setzte die Behandlung mit PAB acht Tage nach der Sulfonamidzufuhr ein, war ein starkes Nachlassen der Wirkung zu beobachten, und begann das Einhängen nach zehn Tagen, war kein Rostbefall mehr zu erzwingen. Es ergibt sich also, daß das Rostmyzel zum Teil für die Dauer von acht Tagen in einer mit Sulfonamid behandelten Pflanze am Leben bleiben und dann noch durch PAB-Zufuhr zur Fruktifikation veranlaßt werden kann. Allerdings ist dies nur bei der gewählten Versuchsmethodik möglich, wo die PAB direkt der Infektionszone zugeführt wurde.

In anderen Versuchsreihen wurde die PAB in wechselnden Mengen den Versuchspflanzen einmalig über den Boden gegeben, wobei die Substanzen gleichzeitig, zum Teil aber auch erst das Sulfonamid oder erst die PAB verabfolgt wurde. Im Prinzip ergab sich hierbei die gleiche antagonistische Wirkung zwischen Sulfonamid und Ladogal, vorausgesetzt, daß das Mengenverhältnis annähernd gleich war und das Schwergewicht nicht durch länger vorhergehende Einwirkung zugunsten des einen oder anderen Antagonisten verschoben war. So ist aus den in Tab. 1 wiedergegebenen Befunden einer Versuchsreihe zu ersehen, daß eine Gabe von 0,03 g PAB in keinem Falle ausreicht, die Wirkung von 0,6 g Ladogal zu kompensieren. 0,1 und 0,3 g PAB heben die Wirkung von 0,6 g Ladogal teilweise auf, wenn sie am gleichen Tage gegeben werden, lassen das Sulfonamid gar nicht zur Wirkung kommen, wenn sie drei Tage vorher dem Boden zugeführt werden, können sich umgekehrt aber überhaupt nicht auswirken, wenn das Ladogal drei Tage vorher verabfolgt wird. Fehlen auch quantitative Vergleichsmöglichkeiten, so scheint doch ein wesentlicher Wirkungsunterschied zu bestehen, je nachdem ob die PAB durch die Blätter aufgenommen werden kann oder ob sie den langen Weg durch die Wurzeln bis zur Infektionszone zurückzulegen hat.

*Tabelle 1*

Die Beeinflussung des Infektionsbildes durch zeitlich unterschiedliche Gaben von Sulfonamid (Ladogal) und wechselnde Mengen PAB zum Boden der Versuchsgefäße

Weizensorte: Michigan Amber. Beimpft mit *P. triticina* am 2. Mai 1951

| PAB bzw. Ladogal in g je Versuchsgefäß gegeben am: | | | | Befallsbild am: |
|---|---|---|---|---|
| 29. 4. | | 2. 5. | | 12. 5. |
| PAB | Ladogal | PAB | Ladogal | |
| — | — | — | — | IV ± |
| — | 0,6 | — | — | i-0 |
| — | 0,6 | 0,03 | — | i-0 |
| — | 0,6 | 0,1 | — | i-0 |
| — | 0,6 | 0,3 | — | i-0 |
| — | — | — | 0,6 | i |
| 0,03 | — | — | 0.6 | i |
| 0,1 | — | — | 0,6 | IV ± |
| 0,3 | — | — | 0,6 | IV ± |
| — | — | 0,03 | 0,6 | i-0 |
| — | — | 0,1 | 0,6 | 2/3 : 0, 1/3 : III |
| — | — | 0,3 | 0,6 | 1/2 : 0, 1/2 : III |

b) Versuche mit *P. simplex* und *P. coronata*

Einige Versuche wurden mit *P. simplex* auf Gerste von Fong Tien und mit *P. coronata* auf Flämings Goldhafer durchgeführt.

Durch eine Gabe von 2,0 g/100 qcm Ladogal blieb die Gerste völlig rostfrei. Wurde den Gerstenpflanzen gleichzeitig 0,5 g PAB über den Boden zugeführt, so ließ sich die Sulfonamidwirkung nicht aufheben. Einhängen der mit Ladogal behandelten Pflanzen 24 Stunden nach dem Beimpfen für drei Nächte in 0,1 %ige PAB-Lösung führte dagegen zu lockerem Pustelausbruch.

Entsprechende Ergebnisse wurden mit *P. coronata* erzielt, wobei allerdings wieder wie stets starke Schäden infolge der Sulfonamidbehandlung festzustellen waren. Die Schäden ließen sich auch durch nachträgliche PAB-Zufuhr zu den Blättern nicht vermeiden.

### 3. Untersuchungen über den Antagonismus zwischen einem Sulfon und PAB

In den früheren Untersuchungen hatte Baludon teilweise eine befriedigende rostunterdrückende Wirkung erkennen lassen, wenngleich Unregelmä-

ßigkeiten in der Wirkung zu der Annahme führten, daß möglicherweise auch eine gewisse gasförmige Wirkung erfolgt.

Diese ungleichmäßige Wirkung zeigte sich auch wieder in den vorliegenden Untersuchungen. In vier größeren, mit Michigan Amber und *P. triticina* durchgeführten Versuchsreihen ließ sich in keinem Fall ein ganz übereinstimmendes Befallsbild auf den für die einzelnen Baludonkonzentrationen jeweils verwendeten 20 bis 25 Versuchspflanzen erzielen. Neben einem mehr oder weniger hohen Prozentsatz völlig oder nahezu rostfreier Pflanzen traten vereinzelt auch Pflanzen mit normalem Pustelausbruch auf.

Wie früher schon hervorgehoben wurde, wird Baludon von den Versuchspflanzen relativ gut vertragen. Erst bei Gaben von 2,5 g/100 qcm aufwärts zeigen sich Wuchshemmungen und Spitzennekrosen.

Wurden mit Baludon am Tage des Beimpfens behandelte Pflanzen nach 24 Stunden für drei Nächte in PAB-Lösungen von 0,05 % und 0,1 % eingehängt, so wurde im allgemeinen die rosthemmende Wirkung des Baludons aufgehoben; die Pflanzen zeigten in der Regel das gleiche Befallsbild wie die Kontrollen. Jedoch traten auch hierbei gelegentlich Unregelmäßigkeiten auf, wo die PAB die Baludonwirkung nicht kompensierte. Eine Erklärung hierfür kann nicht gegeben werden.

Pflanzen, die phytotoxisch wirkende Gaben von Baludon erhalten hatten, zeigten keine Schäden, wenn sie drei Nächte in PAB-Lösung eingehängt worden waren, ein Beweis, daß ein spezifischer Antagonismus zwischen Baludon und PAB vorliegen muß. Auffallend war, daß die mit Baludon und später zusätzlich mit PAB behandelten Pflanzen tief dunkelgrün waren.

### 4. Untersuchungen über die rosthemmende Wirkung von Estern der PAB und von p-Aminosalicylsäure

Im Hinblick auf den hypothetischen Chemismus der Sulfonamidwirkung wäre zu erwarten, daß außer den Sulfonamiden auch andere Substanzen als Antagonisten der PAB auftreten könnten, wenn ihre Struktur derjenigen der PAB ähnelt. In der Tat sind auch schon mehrfach derartige Substanzen aufgefunden worden (Auhagen, 2; Koelzer und Giesen, 35; Kuhn und Mitarbeiter, 37, 38; Roholt, 57; u. a.). Unter anderen gehören hierzu die Ester der PAB, die als Lokalanästhetika in der Medizin Verwendung finden, und die p-Aminosalicylsäure (PAS). Die Angaben sind aber gerade für diese Substanzen und je nach den als Untersuchungsobjekt dienenden Organismen unterschiedlich, ja sogar widersprechend. Da alle diese Feststellungen in Versuchen in vitro gewonnen wurden, muß nach Kuhn, Möller, Wendt und Beinert (38) damit gerechnet werden, daß es möglicherweise zu einer teilweisen Verseifung der Derivate kommt, zumal die Substanzen mit den Nährböden sterilisiert werden. Denkbar wäre auch, daß die Ester eine Aktivierung oder Synthetisierung der PAB veranlassen.

Versuche mit Rostpilzen müssen zwangsläufig in vivo durchgeführt werden. Es liegen mithin andere Voraussetzungen vor, die vielleicht eine sulfon-

amidähnliche Wirkung dieser Substanzen im Sinne der einleitend gebrachten Ausführungen zulassen. Einige Ester der PAB und PAS wurden daher unter diesem Gesichtspunkt an rostinfizierten Weizenkeimpflanzen geprüft.

Von den Estern der PAB kamen zur Anwendung: Anaesthesin, Propäsin, Pantocain, Novocain und Larocain. Anaesthesin und Propäsin wurden in Substanz, mit Quarzsand verrieben, auf die Bodenoberfläche ausgestreut und dann mit der oberen Bodenschicht vermengt, die übrigen Ester wurden in Wasser gelöst gegeben.

In elf Versuchsreihen mit Michigan Amber und *P. triticina*, in denen Anaesthesin in steigenden Mengen von 0,12 bis 1,5 g/100 qcm 72-0 Stunden vor dem Beimpfen den Pflanzen über den Boden zugeführt wurde, bewirkte es in der Regel eine eindeutige, mit der Konzentration zunehmende Minderung des Rostbefalls. Eine völlige Befallsfreiheit der Pflanzen ließ sich allerdings niemals erzielen; vereinzelte Uredolager kamen immer noch zur Ausbildung. Schäden der Versuchspflanzen kamen im allgemeinen erst bei den stärksten Konzentrationen, und dann nicht regelmäßig, in Form von Spitzenchlorosen und -nekrosen und Rollerscheinungen der Blätter zur Beobachtung. Zugabe von PAB zu den mit Anaesthesin versorgten Pflanzen oder Einhängen in PAB-Lösung nach der bekannten Methode erwies sich praktisch für das spätere Befallsbild wirkungslos. Die Blätter nahmen aber durch das Einhängen in PAB-Lösung eine auffallend dunkelgrüne Farbe an, wiesen allerdings gelegentlich auch verstärkte Nekrosen auf.

Propäsin wirkte ähnlich wie Anaesthesin. Auch hier war die Rostunterdrückung niemals vollkommen, auch hier war in einzelnen Versuchsreihen ein mehr oder weniger weitgehendes Nachlassen bzw. Versagen der Wirkung zu beobachten. Durch Zufuhr von PAB ließ sich die rosthemmende Wirkung nicht aufheben.

Pantocain lieferte als erstes wasserlösliches Präparat dieser Reihe die überzeugendsten und befriedigendsten Ergebnisse. Durch 1,25 bzw. 1,5 g Pantocain auf 100 qcm, die am Tage des Beimpfens oder 24 Stunden vorher gegeben wurden, ließ sich in der Regel der Rostbefall völlig unterbinden. Gelegentlich traten bei diesen Konzentrationen schwache Wuchshemmungen der Versuchspflanzen auf. Wurden die Pflanzen nachträglich in PAB-Lösung eingehängt, so kam es zu stärkerem Pustelausbruch als auf den Kontrollpflanzen, d. h. zu einem eindeutigen antagonistischen Effekt, wie er sonst in Versuchen mit Sulfonamiden und PAB festgestellt worden war.

Novocain wirkte meist auch rostmindernd, wenn auch deutlich schwächer als die vorerwähnten Ester. Schäden wurden bis zur angewandten höchsten Gabe von 1,5 g nicht festgestellt. Einhängen mit Novocain gedüngter Pflanzen in PAB-Lösung bewirkte keine Änderung des Infektionstypus, zuweilen aber das Auftreten von Nekrosen bei dunklerem Grün der Blätter, ähnlich wie es schon für Anaesthesin verzeichnet worden war.

Larocain gaben bis 1,25 g ließen niemals eine Wirkung auf den Rostbefall erkennen

Die Befunde ergeben ein recht uneinheitliches Bild und lassen nicht erkennen, welche Bedeutung den Seitenketten jeweils zukommt. Überraschend ist, daß gerade Pantocain die stärkste Wirkung aufweist, obwohl es der einzige Ester ist, in dem die Aminogruppe durch Bindung an Butyl verändert ist. Die mit Pantocain stets zu erzielende Rostunterdrückung und die bei den übrigen Estern vielfach zu beobachtende rosthemmende Wirkung gestatten aber immerhin den Schluß, daß die Ester im Prinzip eine sulfonamidähnliche Wirkung entfalten können.

Bei der Prüfung der Frage, wie sich die Verabfolgung eines PAB-Esters auswirkt, wenn die Versuchspflanzen vorher mit Sulfonamiden behandelt worden sind, ergaben sich völlig widersprechende Befunde. In den Versuchen, die nur mit Novocain durchgeführt wurden, war zum Teil überhaupt keine Wirkung zu beobachten, zum Teil war ein Antagonismus festzustellen, zum Teil schließlich — bei suboptimalen Gaben von Ladogal oder Aristamid — ließ sich die rostmindernde Wirkung der Sulfonamide deutlich durch Novocainzufuhr verstärken.

PAS (wie auch „PAS“ mit meta-Stellung der Aminogruppe) führte bis zu Konzentrationen, die Schädigungen bewirkten, keine Änderung des Rostbefalls herbei. In einer Versuchsreihe ließ sich durch PAS (nicht durch meta-AS) die rostmindernde Wirkung von Aristamid aufheben. Da dieses Ergebnis nicht durch Wiederholung gesichert ist, muß es dahingestellt bleiben, inwieweit hieraus Rückschlüsse auf eine antisulfonamidische Wirkung der PAS gezogen werden dürfen.

### 5. Untersuchungen über die Wirkung von PAB auf das Rostverhalten

Um zu klären, wie sich eine Zufuhr von PAB ohne gleichzeitige Gabe von rosthemmenden Substanzen auf das Infektionsbild auswirkt, wurde eine größere Anzahl von Weizensorten unterschiedlicher Anfälligkeit 24 Stunden nach dem Beimpfen mit *P. triticina* drei Nächte in 0,1 %ige PAB-Lösung eingehängt. Im allgemeinen zeigte diese Maßnahme keine Wirkung auf das Rostbild. Bei manchen resistenten Sorten indessen (z. B. Roter Tiroler Spelz oder Rottweiler Dinkel) bewirkte die PAB-Zufuhr eine frühzeitiger einsetzende und stärkere Nekrose, als sie die Kontrollen aufwiesen. Die gleiche Beobachtung wurde bei Hildebrandts weißem Viktoria und bei Sizilianischem Binkel gemacht, wenn den Pflanzen am zweiten und dritten Tage nach dem Beimpfen pro Topf 1,0 g PAB über den Boden zugeführt wurde. Bei mäßig oder stark anfälligen Infektionstypen wurde durch PAB keinerlei Veränderung des Infektionstypus herbeigeführt. Auch die umgekehrte Erscheinung, daß ein normalerweise resistenter Infektionstypus durch PAB mehr oder weniger nach der anfälligen Seite verschoben wurde, ließ sich niemals feststellen.

Das Unvermögen von *P. triticina*, die nichtkongenialen Getreidearten Hafer, Gerste und Roggen überhaupt oder in nennenswertem Ausmaß zu befallen, wurde erwartungsgemäß durch zusätzliche PAB-Gaben nicht behoben.

### 6. Versuche mit Pikrinsäure und PAB

Unter den früher von uns als rosthemmend befundenen Substanzen zeichnete sich u. a. Pikrinsäure durch besondere Wirksamkeit aus (Gassner und Hassebrauk, 24). Die Prüfung der Frage, ob die rostmindernde Wirkung der Pikrinsäure durch PAB aufgehoben werden kann, führte zu einem negativen Befund. Der Infektionstypus 0, der durch eine 72 bis 24 Stunden vor der Beimpfung mit *P. triticina* verabfolgte optimale Gabe von Pikrinsäure herbeigeführt werden konnte, zeigte keine Änderung, wenn die Pflanzen 24 Stunden nach dem Beimpfen drei Nächte in 0,1prozentige PAB-Lösung eingehängt wurden.

### 7. Besprechung der Ergebnisse

Die bedeutsame Frage, auf welche Weise die rostunterdrückende Wirkung bestimmter, von den Wirtspflanzen durch die Wurzeln aufgenommener Chemikalien zu erklären sei, ist von Gassner und mir bereits anläßlich unserer ersten chemotherapeutischen Untersuchungen diskutiert worden. Die naheliegende Erklärung, daß die Unterbindung der Fruktifikation des biotrophen Erregers auf eine Schwächung des Wirtsorganismus zurückzuführen sei, konnte, wie bereits diese ersten Versuchsergebnisse erkennen ließen, in den meisten Fällen nicht in Betracht gezogen werden, da zwischen den phytotoxischen Nebenwirkungen und dem Ausmaß der rosthemmenden Wirkung gerade bei den wirksamsten Substanzen durchaus keine Parallele festzustellen war. Wir hatten uns schließlich mit der unbefriedigenden Auffassung bescheiden müssen, „daß die geringen von den Wurzeln aufgenommenen Mengen wirksamer Substanz entweder in die Wechselbeziehungen von Pilz und Nährpflanze störend eingreifen oder aber für den eindringenden oder eingedrungenen Rostpilz in ganz spezifischer Weise giftig sind“ (24, S. 446). Wie sich ein solcher Eingriff im einzelnen abspielt, oder welche Bestandteile des Moleküls wirksamer Substanzen spezifisch toxisch für den Erreger sind, ließ sich an Hand unserer ersten Erfahrungen nicht entscheiden.

Die vorstehend beschriebenen Versuchsergebnisse sind nun geeignet, wenigstens für eine bestimmte Gruppe chemotherapeutisch wirksamer Substanzen das Dunkel um ihren Wirkungsmechanismus aufzuhellen.

Die Resultate sprechen dafür, daß sich die rosthemmende Wirkung der Sulfonamide irgendwie auf dem Wege einer Verdrängung der PAB vollzieht. Das haben die Versuche mit Sulfonamiden eindeutig erwiesen, während die mit den Estern der PAB erzielten Ergebnisse zumindest nicht gegen diese Feststellung sprechen. Wenn sich bei der Verabfolgung der PAB-Ester nicht in allen Fällen die gleiche vollständige Rostunterbindung herbeiführen ließ wie mit Sulfonamiden, und wenn auch die Aufhebung des Hemmeffektes durch PAB nicht immer in überzeugender Weise gelang, so ist hierfür wohl folgende Erklärung heranzuziehen: Auf dem Wege über den Erdboden und durch die Wurzeln zur Infektionszone kommt es zu einer mehr oder weniger weitgehenden Aufspaltung der Ester, so daß in der Infektionszone neben unzersetzten Molekülen auch wechselnde Mengen freier PAB in Wirksamkeit

treten. Die Labilität der Ester hatte ja, wie erwähnt, auch bei in vitro-Untersuchungen anderer Autoren zu gegensätzlichen Ergebnissen geführt. Unter dieser Annahme wäre dann auch erklärlich, daß bei PAB-Zufuhr zu mit PAB-Estern gedüngten Pflanzen gelegentlich Schadbilder auftreten. Bei einem dadurch zuweilen bedingten Überangebot der PAB muß sich ihr normalerweise günstiger Effekt ins Gegenteil verkehren.

Kann somit nicht bezweifelt werden, daß der rosthemmende Einfluß der als wirksam befundenen Sulfonamide grundsätzlich auf dem gleichen Antagonismus zu PAB beruht wie bei allen anderen Organismen, die daraufhin untersucht worden sind, so muß dennoch die Frage aufgeworfen werden, ob es sich hier um eine mittelbare oder unmittelbare Auswirkung auf den Rostpilz handelt. Wir sehen uns ja bei diesen in vivo durchgeführten Untersuchungen dem Komplex Wirtspflanze—Erreger gegenüber, müssen also die Möglichkeit einer Sulfonamidwirkung sowohl auf die eine wie die andere Komponente dieses Systems in Erwägung ziehen. Eine nachteilige Einwirkung auf den Stoffhaushalt des Wirtes könnte dabei unter Umständen indirekt für den obligat biotrophen Rostpilz entsprechende Rückwirkungen haben, ohne daß die Sulfonamide für diesen selbst unmittelbar schädlich zu sein brauchten. Welche Erfahrungen liegen nun über die Wirkung von Sulfonamiden auf höhere Pflanzen und auf Pilze vor?

Bei den höheren Pflanzen lassen die vorwiegend an Wurzeln der verschiedensten Objekte durchgeführten Untersuchungen in erster Linie eine mehr oder weniger weitgehende Beeinflussung des Längenwachstums erkennen. Es herrscht Übereinstimmung dahingehend, daß die Sulfonamide, vor allem in stärkeren Konzentrationen, die Keimung oder das Längenwachstum der Wurzeln hemmen (Audus and Quastel, 1; Bauch, 5; Bonner, 9; Fourneau und Mitarbeiter, 21; Grace, 25; Hindmarsh, 32; Macht and Kehoe 45, Mangenot et Carpentier, 46, 47; Schopfer und Anker, 61; Spencer, 63; Stoll, 65; Wiedling, 74). Mehrfach wurde daneben die erstmals von Grace (25) verzeichnete Beobachtung bestätigt, daß manche Sulfonamide in geringen Konzentrationen ausgesprochen wachstumsfördernd wirken können (Audus and Quastel, 1; Macht and Kehoe, 45; Spencer, 63; Traub 68). Im einzelnen ergeben sich gelegentlich mehr oder weniger voneinander abweichende Befunde, die durch die Wahl der verwendeten Sulfonamide, der Versuchsobjekte und der Methodik zu erklären sein dürften. — Von Eigsti (15) und Mehra (48) liegen Beobachtungen vor, daß Sulfonamidbehandlung zu Störungen der Mitose im Pollenschlauch von *Tradescantia occidentalis* bzw. in *Ephedra*-Pollen führt. Bauch (5) fand Störungen der Zellteilung bei mit Sulfonamid behandelten Mais- und Zwiebelwurzeln. Eingehendere cytologische Untersuchungen von Traub (68), gleichfalls an Zwiebelwurzeln und an Bohnenpflanzen, die aus mit Sulfonamiden behandelten Samen hervorgegangen waren, deckten starke mitotische Störungen, vor allem vielfach auch Polyploidisierung auf, die zu Mißbildungen verschiedenster Art führte. — Spencer (63) hebt die Tatsache hervor, daß Sulfonamidbehandlung an höheren Pflanzen zu ziemlich ausgedehnten Chlorosen führen kann. — Nach Schopfer und Anker

*Tabelle 2:* Die Wirkung von Sulfonamiden auf Pilze in vitro

| Pilz | Präparat | Wirkung | PAB | Autor |
|---|---|---|---|---|
| *Mucor (Lichtheimia) italica* | Sulfonamid | Wuchshemmung, unabhängig vom pH | | Fourneau et al., 21 |
| | Prontosil | wirkungslos | | |
| *M. hiemalis* | Cibazol und Na-Cibazol | kaum hemmend | | Mirimanoff-Olivet, 50 |
| *M. corymbifer* | Mehrere Sulfonamide (S.-thiazol, S.-diazin, S.-guanidin, S.-merazin) | Sulfonamid hemmend, andere kaum | | Senturia & Wolf, 62 |
| *Rhizopus oryzae* | Cibazol und Na-Cibazol | kaum hemmend | | Mirimanoff-Olivet, 50 |
| *Eremothecium Ashbyii* | Sulfonamid | hemmend | | Schopfer, 60 |
| *Neurospora crassa* | Sulfonamid | Wuchs und Konidienkeimung, nicht Atmung hemmend | antag. | Tatum & Beadle, 66 |
| *Aspergillus niger* | Sulfonamid und Prontosil | Wuchs gehemmt durch Sulfonamid, nicht d. Prontosil | | Fourneau et al., 21 |
| | Sulfonamid | Keimung und Wuchs gehemmt. Wirkung läßt nach | antag. | Hartelius, 27 |
| | Marfanil | wirkungslos | | Hartelius & Roholt, 28 |
| | Sulfonamid | Wuchs gehemmt, weniger im sauren Bereich | antag. | Lwoff et al., 44 |
| | Cibazol und Na-Cibazol | kaum hemmend | | Mirimanoff-Olivet, 50 |
| | Sulfonamid, S.-thiazol, S.-diazin, S.-guanidin, S.-merazin | nur Sulfonamid hemmend | | Senturia & Wolf, 62 |
| *A. fumigatus* | Sulfonamid und Prontosil | Sulfonamid hemmend, Prontosil nicht | | Fourneau et al., 21 |
| | Sulfonamid, S.-thiazol, S.-diazin, S.-guanidin, S.-merazin | nur Sulfonamid hemmend | | Senturia & Wolf, 62 |
| *A. glaucus* | Sulfonamid, S.-thiazol, S.-diazin, S.-guanidin, S.-merazin | nur Sulfonamid hemmend | | Senturia & Wolf, 62 |
| *A. Sydowi* | Sulfonamid, S.-thiazol, S.-diazin, S.-guanidin, S.-merazin | nur Sulfonamid hemmend | | Senturia & Wolf, 62 |
| *A. Janselmi* | Sulfonamid und Prontosil | Sulfonamid hemmend, Prontosil nicht | | Fourneau et al., 21 |
| *Penicillium spinulosum* | Mehrere Sulfonamide | Sulfonamid hemmend, andere kaum | | Senturia & Wolf, 62 |
| *Ophiostoma multiannulatum* | 5-Amino--7-hydroxy-triazolpyrimidin und Sulfonamid | Wuchs hemmend | | Fries & Panders, 22 |
| „Schimmelpilze" | Sulfanilsäure | keine Hemmung in Rohkulturen | | Voderberg, 73 |
| *Coprinus lagopus* | Sulfanilsäure, Marfanil, Cibazol | Wuchs und Fruktifikation gehemmt | antag. | Voderberg, 73 |
| *Lentinus omphalodes* | 5-Amino--7-hydroxy-triazolpyrimidin und Sulfonamid | Wuchs gehemmt | | Fries & Panders, 22 |

*Tabelle 2* (Fortsetzung) Die Wirkung von Sulfonamiden auf Pilze in vitro

| Pilz | Präparat | Wirkung | PAB | Autor |
|---|---|---|---|---|
| *Trichophyton sp.* | Sulfonamid | Wuchshemmung, Gewöhnung bei längerer Kultur | | Blauw Sing, 8 |
| *T. purpureum* | Sulfonamid | Wuchs, aber nicht Keimung gehemmt | antag. | Dimond, 12 |
| | Sulfonamid | hemmend | | Dimond & Thompson, 13 |
| *T. mentagrophytes* | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | geringe Wuchshemmung | | Keeney et al., 34 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| *T. rubrum* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | geringe Wuchshemmung | | Keeney et al., 34 |
| *T. gypseum* | Mehrere Sulfonamide u. z. T. Na-Salze | gewisse Hemmwirkung, vor allem d. Sulfonamid | | Lewis & Hopper, 43 |
| | Sulfonamid | hemmend | | Dimond & Thompson, 13 |
| *Epidermophyton floccosum* | Kupfer-Aethylen-Diaminsulfon-komplexe | keine Wuchshemmung | | Erdos, 18 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | kaum Hemmung, durch Thiazol gar nicht | | Keeney et al., 34 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| *Microsporum Audouini* | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | starke Wuchshemmung | | Keeney et al., 34 |
| *M. felineum* | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | schwache Hemmung durch Thiazol, sonst nicht | | Keeney et al., 34 |
| *M. canis* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| *M. gypseum* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| *Blastomyces dermatitidis* | Kupfer-Aethylen-Diaminsulfon-komplexe | hemmend, vor allem in stärkerer Konzentration | | Erdos, 18 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | völlig wirkungslos | | Keeney et al., 34 |
| | Mehrere Sulfonamide | Sulfadiazin und Sulfonamid hemmend, Pyridin bei hoher Konzentration, andere wirkungslos | | Mirimanoff-Olivet, 50 |
| *Cryptococcus neoformans* | Cu-Aethylen-Diaminsulfonkomplexe | Entwicklung gefördert | | Erdos, 18 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | starke Wachstumshemmung | | Keeney et al., 34 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |

*Tabelle 2* (Fortsetzung) Die Wirkung von Sulfonamiden auf Pilze in vitro

| Pilz | Präparat | Wirkung | PAB | Autor |
|---|---|---|---|---|
| *Candida albicans* | Cu-Aethylen-diaminsulfonkomplexe | wirkungslos | | Erdos, 18 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | wirkungslos | | Keeney et al., 34 |
| | Sulfonamid, Na-Sulfapyridin, Sulfathiazol, Na-Sulfathiazol, Sulfadiazin, Na-Sulfadiazin | wirkungslos | | Lewis & Hopper, 43 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin, -guanidin, -merazin | wirkungslos | | Senturia & Wolf, 62 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *C. Krusei* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *C. tropicalis* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *C. parkrusei* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *C. pseudotropicalis* | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *Phialophora Pedrosoi* | Cu-Aethylendiaminkomplexe | Sulfonamidkomplex stark hemmend | | Erdos, 18 |
| | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | stark hemmend | | Keeney et al., 34 |
| | Mehrere Sulfonamide | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *P. compactum* | Mehrere Sulfonamide | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *P. verrucosa* | Mehrere Sulfonamide | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *Monosporium apiospermum* | Mehrere Sulfonamide | wirkungslos | | Wolf, 75 |
| *Coccidioides immitis* | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | wirkungslos | | Keeney et al., 34 |
| *Sporotrichum Schencki* | Na-Sulfathiazol, -diazin, -merazin | schwache Wuchshemmung | | Keeney et al., 34 |
| | Mehrere Sulfonamide | Sulfonamid und Pyridin stark hemmend, Sulfaguanidin, -thiazol und -pyrazin wirkungslos | | Noojin and Callaway, 54 |
| | Sulfonamid, Sulfathiazol, -diazin und -guanidin | nur Sulfonamid stark hemmend | | Wolf, 75 |
| *Botrytis carnea* | Cibazol und Na-Cibazol | kaum hemmend | | Mirimanoff-Olivet, 50 |

(61) wird die Ribonukleinsäure in mit Sulfonamid behandelten Pflanzen rascher abgebaut als bei den unbehandelten Kontrollen. — Inwieweit andere physiologische Prozesse höherer Pflanzen durch Sulfonamideinwirkung in Mitleidenschaft gezogen werden, ist nicht bekannt.

Der aus der Mikrobiologie bekannt gewordene Antagonismus zwischen Sulfonamiden und PAB ist von verschiedenen Autoren auch bei höheren Pflanzen nachgeprüft und in den meisten Fällen bestätigt worden (Audus and Quastel, Bonner, Hindmarsh, Mangenot et Carpentier, Schopfer und Anker, Stoll, Wiedling). Widerspruchsvoll sind hier vielfach die Ansichten über das zwischen den beiden Antagonisten erforderliche Mengenverhältnis. Während manche Autoren eine weitgehende Aufhebung der Sulfonamidwirkung durch relativ geringe Gaben PAB erzielen konnten (z. B. Bonner, Schopfer und Anker u. a.), betonen andere ausdrücklich, daß im Gegensatz zu allen bakteriologischen Erfahrungen das Mengenverhältnis zwischen den Antagonisten etwa 1 : 1 zu sein hätte (z. B. Audus and Quastel, Hindmarsh). Offenbar spielen auch hier andere Faktoren, wie z. B. der pH, für das Ausmaß der kompensierenden Wirkung eine große Rolle (s. Brücke und Kaindl, 10; Hindmarsh, 32). Im Gegensatz zu allen anderen Angaben steht die Feststellung von Macht und Kehoe (45), daß Sulfonamid und PAB, gemeinsam gegeben, den toxischen, wachstumshemmenden Einfluß bei *Lupinus albus* verstärken.

PAB allein zeigt nach den bisher vorliegenden Erfahrungen an höheren Pflanzen die typischen Auswirkungen eines Wuchsstoffes: stimulierend in geringen Konzentrationen, hemmend in größeren Gaben (Mangenot et Carpentier, Macht and Kehoe, Stoll u. a.). Audus und Quastel verzeichnen bei Wasserkulturen von *Lepidium sativum* sogar schon bei PAB-Konzentrationen von $^{10}/_{1000000}$ eine toxische Wirkung.

Es steht demnach zweifellos fest, daß stärkere Sulfonamidgaben höhere Pflanzen in mehrfacher Hinsicht zu schädigen vermögen. Im Vordergrund steht offenbar die Wirkung auf das Wachstum mit Störungen der Kernteilungsvorgänge, die sich auch hier, wie mehrfach bewiesen werden konnte, durch eine Verdrängung der PAB vollzieht. Meine mit Gramineen durchgeführten Untersuchungen haben gleichfalls Wuchshemmungen und in Übereinstimmung mit Spencers Angaben Chlorosen als augenfälligstes Schädigungssymptom erkennen lassen.

Auf der anderen Seite verfügen wir nun auch schon über gewisse Erfahrungen, wie sich Sulfonamide auf Pilze auswirken. Die Hefen können ja gewissermaßen als klassisches Objekt der Sulfonamidforschung angesehen werden (außer den in der Einleitung schon erwähnten Autoren s. a.: Brücke und Kaindl, 10; Hartelius und Roholt, 26—28; Landy and Dicken, 42; Schopfer, 60; u. a.). Sie nehmen aber als Wuchs- und Wirkstoffproduzenten par excellence offensichtlich eine Sonderstellung gegenüber den anderen Pilzen ein und dürften aus einer vergleichenden Betrachtung besser auszulassen sein. Die an anderen Pilzen gewonnenen Erkenntnisse sind der besseren Übersicht halber in einer Tabelle zusammengestellt worden (Tab. 2).

In die Tabelle sind nur die Ergebnisse aufgenommen worden, die aus in vitro-Untersuchungen gewonnen sind. Von einer Wiedergabe der mit humanpathogenen Pilzen erzielten klinischen Erfahrungen wird wegen der hier bestehenden ganz andersartigen Voraussetzungen abgesehen (vgl. dazu NICKERSON, 53; WORTMANN, 78), und auf die wenigen bisher an phytopathogenen Pilzen in vivo gemachten Beobachtungen ist a. O. bereits eingegangen (CHAPMAN, 11; HASSEBRAUK, 29; MITCHELL und Mitarbeiter, 51). In den weitaus meisten Fällen erstrecken sich die einschlägigen Untersuchungen auf Pilze, die als Erreger von Dermatomykosen oder als Saprophyten bekannt sind. Lediglich *Eremothecium Ashbyii* und einige *Aspergillus*-Arten sind phytopathogen. Mehrfach finden sich allerdings Gattungen, denen phytopathologisch bemerkenswerte Arten zuzurechnen sind.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, werden Vertreter aus allen Pilzklassen in der Regel durch Sulfonamide im Wachstum gehemmt. Im einzelnen sind mehr oder weniger stark abweichende Angaben über das Ausmaß der Wuchshemmung und auch hinsichtlich der Auffassung zu verzeichnen, ob sich die Hemmung in erster Linie auf die Mycelbildung oder die Bildung und Keimung der Fruktifikationsorgane erstreckt. Diese Unterschiede dürften zum Teil auf die Prüfung verschiedenartiger Sulfonamidverbindungen wie aber auch auf die modifizierende Wirkung anderer Faktoren (pH, chemische Zusammensetzung des Substrats, unterschiedliche Toleranz der Pilzstämme usw.) zurückzuführen sein. Neben vereinzelten Angaben über die Wirkungslosigkeit von Sulfonamiden auf *Coccidioides immitis, Monosporium apiospermum* und *Phialophora spp.* stehen dann die übereinstimmenden Beobachtungen mehrerer Autoren, daß die *Candida*-Arten durch Sulfonamide niemals eine Wuchshemmung erleiden. Auch der nahestehende *Cryptococcus neoformans* scheint durch Sulfonamide kaum im Wuchs gehemmt, unter Umständen sogar gefördert zu werden. Es sei in diesem Zusammenhang auf die eigenartige Mutante von *Neurospora crassa* verwiesen, die einen ausgesprochenen Sulfonamidbedarf aufweist (EMERSON und CUSHING, 16, 17). Mehrere Autoren stellten auch bei Pilzen den bekannten Antagonismus zwischen Sulfonamiden und PAB fest. Vereinzelt wird eine langsame Gewöhnung der Kulturen an Sulfonamid, offenbar infolge PAB-Synthese, angegeben.

Auf die Feststellung VODERBERGS (73), daß „Schimmelpilze" gegen Sulfanilsäure gänzlich unempfindlich seien, und die Vermutung, daß es sich bei der in Versuchen mit *Coprinus lagopus* beobachteten fungostatischen Wirkung der Sulfanilsäure de facto um eine indirekte Wirkung auf dem Wege über mit dem Mycel vergesellschaftete Bakterien handele, sei nur kurz hingewiesen. Die zahlreichen bereits vorliegenden einschlägigen und eindeutigen mykologischen Untersuchungsbefunde waren der Autorin nach ihren eigenen Angaben nicht bekannt.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß auch bei den meisten daraufhin geprüften Pilzen das Wachstum durch Sulfonamide gehemmt wird. Der mehrfach nachgewiesene Antagonismus zu PAB läßt vermuten, daß wir im Prinzip mit dem gleichen Eingriff der Sulfonamide in den Stoffwechsel zu rechnen haben wie bei anderen Organismen.

Es ergibt sich nun die Frage: Ist die von mir beobachtete Rostunterdrückung durch Sulfonamide als mittelbare Auswirkung zu betrachten, indem, wie oben bereits angedeutet, eine Schwächung des Wirtsorganismus für den obligat parasitischen Erreger die Lebensbedingungen erschwert, oder bestehen spezifische Ansprüche der Uredineen an PAB, die sie nach Sulfonamidzufuhr aus dem Substrat nicht mehr zu decken vermögen. Mit Sicherheit läßt sich diese Frage nicht beantworten. Es ist aber mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die Rostpilze wie viele andere Pilze einen spezifischen Bedarf an PAB für ihre Entwicklung aufweisen, daß sie diesen Bedarf aus ihrer Wirtspflanze decken, und daß somit die rosthemmende Wirkung der Sulfonamide im Einklang mit den an anderen Organismen gewonnenen Erfahrungen auch hier primär auf eine Verdrängung der für den Erreger lebensnotwendigen PAB zurückzuführen ist. Dafür spricht die in einer großen Anzahl von Untersuchungen immer wieder gewonnene Feststellung, daß die Fruktifikation der Roste durch Sulfonamide völlig unterbunden werden kann, auch wenn die Wirtspflanzen ganz ungeschädigt erscheinen, daß ferner die Wirkung der Sulfonamide nahezu schlagartig einsetzt, d. h. daß unmittelbar vor dem Beimpfen verabfolgte Sulfonamidgaben bereits die Sporulation verhindern.

Ergibt sich also als wichtigster Befund aus diesen mit Sulfonamiden durchgeführten Untersuchungen, daß auch bei den Rostpilzen die Weiterentwicklung offenbar durch eine Verdrängung der PAB unterbunden wird, so soll die Möglichkeit, daß die Sulfonamide daneben auch noch auf anderem Wege störend in das symbiontische Verhältnis von Wirt und Rostpilz eingreifen, nicht abgesprochen werden. Doch sind zur Zeit alle Aussagen in dieser Hinsicht spekulativ.

Wir können lediglich noch der Frage nähertreten, ob sich die Ausschaltung der PAB auf den Rostpilz direkt schädigend oder zunächst nur entwicklungshemmend auswirkt. Ganz offensichtlich ist die Wirkung in Übereinstimmung mit allen anderen bisher an Bakterien und Pilzen gewonnenen Erfahrungen zunächst nur hemmend. Der Versuch, beimpfte und mit Ladogal behandelte Pflanzen in zunehmendem Abstande vom Tage des Beimpfens mit PAB zu versorgen, hat ja ergeben, daß nach dem Haften der Infektion das Rostmycel in den mit Sulfonamid behandelten Pflanzen in einem latenten Zustande verharrt und noch nach wenigstens acht Tagen zur Weiterentwicklung und Fruktifikation befähigt ist.

Der Wirkungsmechanismus der in der Phytopathologie als chemotherapeutisch wirksam befundenen Substanzen war bisher völlig in Dunkel gehüllt. Es mußte schon als Positivum gewertet werden, wenn es Meyer (49) nachzuweisen gelang, daß Cadmiumsalze nicht direkt auf *Erysiphe graminis* als Therapeutikum einwirken, sondern die Reaktionslage der damit gedüngten Getreidepflanzen günstig beeinflussen. Mit dem Nachweis, daß die rostunterdrückende Wirkung der Sulfonamide auf die Verdrängung eines lebensnotwendigen Wuchsstoffes zurückzuführen ist, eröffnet sich ein ganz neuer Aspekt hinsichtlich der Chemotherapie pflanzlicher Infektionskrankheiten. Wir haben damit wenigstens für einen Teil der Chemotherapeutika Einblick

in ihren Wirkungsmechanismus gewonnen, der uns möglicherweise neue Wege weisen kann. Ob es allerdings damit gelingt, den für das Problem der Chemotherapie pflanzlicher Infektionskrankheiten besonders bedeutungsvollen Engpaß des begrenzten chemotherapeutischen Index befriedigend zu überwinden (vgl. GÄUMANN, 23, S. 632), muß einstweilen dahingestellt bleiben. Da PAB auch für die Wirtspflanzen ein wichtiger Wuchsstoff ist, könnte sich höchstens dadurch eine günstigere Konstellation ergeben, wenn hinsichtlich der quantitativen Ansprüche an PAB und damit auch hinsichtlich der Toleranz für Sulfonamide zwischen höheren Pflanzen und den kryptogamen Erregern Unterschiede beständen.

Ob der speziell für Sulfonamide erkannte Wirkungsmechanismus auch noch für das eine oder andere Chemotherapeutikum Gültigkeit hat, läßt sich nur von Fall zu Fall nachprüfen. Theoretisch wäre bei manchen Substanzen auf Grund einer gewissen strukturellen Ähnlichkeit mit PAB die Möglichkeit gegeben. In den weitaus meisten Fällen müssen wir aber wohl mit einer anderen Wirkungsweise rechnen. So hatten ja auch die mit Pikrinsäure durchgeführten Versuche den im Hinblick auf die Konstitution der Pikrinsäure nicht überraschenden Befund gegeben, daß hier ein Antagonismus zu PAB der rosthemmenden Wirkung nicht zugrunde liegt.

Als eines der bemerkenswertesten Ergebnisse aus den vorliegenden Untersuchungen darf die Schlußfolgerung angesehen werden, daß allem Anschein nach PAB auch für Uredineen ein lebensnotwendiger Wuchsstoff ist. Wir sind somit in der Lage, zum erstenmal eine weitgehend gesicherte Aussage über spezifische Wuchsstoffansprüche dieser Parasiten machen zu können, die bisher so hartnäckig allen Bemühungen getrotzt haben, Einblick in ihre Stoffansprüche zu gewinnen. Es ist auf Grund der in vivo durchgeführten Untersuchungen nicht möglich, zu entscheiden, ob die Rostpilze selbst zur Synthetisierung von PAB befähigt oder ob sie darauf angewiesen sind, die erforderliche PAB von ihrer Wirtspflanze geliefert zu bekommen. Gesetzt den Fall, sie wären PAB-heterotroph, so könnte vielleicht erwogen werden, ob nicht mangelnde Aggressivität gegenüber einer nicht kongenialen Wirtsart mit einem zu geringen Angebot oder eher noch mit einem unterschiedlichen Bedarf der einzelnen Rostarten an PAB im Zusammenhang stände. Derartige Vorstellungen lassen sich bei dem heutigen Stande unseres Wissens nicht mehr vertreten (s. GÄUMANN, S. 331). Zur Widerlegung solcher Gedankengänge durchgeführte Untersuchungen haben erwartungsgemäß stets eindeutig bewiesen, daß solche Vorstellungen völlig abwegig sind. Durch ein zusätzliches Angebot von PAB kann mangelnde Aggressivität nicht erzwungen werden.

Ebenso indiskutabel ist es, die Erscheinungen unterschiedlicher Resistenz auf diesem Wege, d. h. mit einem mehr oder weniger stark ausgeprägten PAB-Mangel erklären zu wollen. Im Gegenteil: sowohl meine früheren mit Sulfonamiden wie die jetzt mit PAB an mäßig bis stark resistenten Sorten durchgeführten Untersuchungen sprechen für dynamische Grundlagen der Resistenz, auf die PAB allerdings, wenn auch in anderem Sinne, einen gewissen Einfluß

hat. Verdrängung der PAB durch Sulfonamidgaben lähmt die Pathogenität des Pilzes und bedingt ein Abklingen der chlorotischen und nekrotischen Symptome; umgekehrt erhöhen PAB-Gaben die Virulenz und lassen die Manifestationen der Resistenz verstärkt und verfrüht auftreten.

Somit sind weder mangelnde Aggressivität noch Resistenzunterschiede mit dem unterschiedlichen Bedarf der Uredineen an PAB bzw. mit einem unterschiedlichen Angebot dieses Wuchsstoffes seitens der Wirtspflanze zu erklären. Aber auch die von mir in meiner ersten Mitteilung aufgeworfene Frage, ob das viel diskutierte und bearbeitete, aber bis heute ungeklärte Phänomen des obligaten Parasitismus mit den PAB-Ansprüchen der Rostpilze zusammenhängen könne, muß bei reiflicher Überlegung in dieser Ausschließlichkeit verneint werden. Wenn wir aber in Konsequenz der vorhergehenden Ausführungen unterstellen, daß die Uredineen PAB-heterotroph sind, dann ist aus den gewonnenen Erkenntnissen zu folgern, daß Kulturversuchen mit Rostpilzen auf synthetischem Substrat, wenn überhaupt, nur dann Erfolg beschieden sein kann, wenn dieses unter anderem PAB bzw. hieraus hervorgehende höhere Komplexe, wie die Folinsäure, enthält.

## 8. Zusammenfassung

1. In Versuchen mit *Puccinia triticina, P. simplex* und *P. coronata* wurde nachgewiesen, daß die rosthemmende Wirkung geeigneter Sulfonamidpräparate durch annähernd äquivalente Gaben von p-Aminobenzoesäure (PAB) völlig aufgehoben werden kann.

2. Aus der Feststellung, daß Braunrostmycel in mit Ladogal behandelten Weizenpflanzen durch PAB-Zufuhr noch nach wenigstens acht Tagen zur Fruktifikation veranlaßt werden kann, geht hervor, daß
   a) die Infektion auf mit Sulfonamid gedüngten Pflanzen zunächst zum Haften kommt, und daß
   b) die Sulfonamide eine fungostatische, aber keine fungizide Wirkung auf den Rostpilz ausüben.

3. Die rosthemmende Wirkung des Sulfons Baludon konnte in mit *P. triticina* durchgeführten Untersuchungen gleichfalls durch PAB in den meisten Fällen aufgehoben werden.

4. Von den Estern der PAB blieb Larocain ohne Einfluß auf den Befall mit *P. triticina*. Novocain hatte eine schwache, Anaesthesin und Propäsin entwickelten eine stärkere, wenn auch nicht ganz regelmäßige rostunterdrückende Wirkung. Pantocain wirkte sulfonamidartig und erwies sich eindeutig als Antagonist der PAB.

5. p-Aminosalicylsäure hatte keine rosthemmende Wirkung.

6. PAB allein hatte nur bei hochresistenten Weizensorten einen differenzierenden Einfluß auf den Infektionstypus: die Chlorosen und Nekrosen setzten verfrüht ein und waren verstärkt.

7. Die rosthemmende Wirkung von Pikrinsäure konnte durch PAB nicht aufgehoben werden.

8. Aus den Versuchsergebnissen werden als wichtigste Folgerungen gezogen:

   a) Die rosthemmende Wirkung der Sulfonamide vollzieht sich analog den mit anderen Organismen gewonnenen Erfahrungen auf dem Wege einer Verdrängung der PAB. Die Möglichkeit, daß die Sulfonamide auch noch auf andere Weise in das symbiontische Verhältnis von Wirt und Rostpilz eingreifen, wird offengelassen.

   b) Höchstwahrscheinlich resultiert die Entwicklungshemmung des Rostpilzes aus einer direkten Auswirkung des PAB-Entzuges und nicht mittelbar aus einer unspezifischen Schwächung der durch die Verdrängung der PAB gleichfalls geschädigten Wirtspflanze.

   c) PAB ist für die Uredineen offenbar ein unentbehrlicher Wuchsstoff.

   d) Trotz dieser Feststellungen ist es nicht angängig, mangelnde Aggressivität oder Pathogenität mit einem unterschiedlichen Angebot von PAB seitens der Wirtspflanze bzw. mit unterschiedlichen Ansprüchen an PAB seitens des Erregers in Zusammenhang bringen zu wollen. Ebensowenig läßt sich die Erscheinung des obligaten Parasitismus mit dem Bedarf der möglicherweise PAB-heterotrophen Uredineen erklären.

## 9. Literaturverzeichnis


1. Audus, L. J. and Quastel, J. H.: The growth inhibitory activity of the sulfonamides and plant growth-substances, and the effects thereon of p-aminobenzoic acid. Ann. Botany N. S. **12**, 1948. 27.
2. Auhagen, E.: p-Aminophenylketone als Antagonisten der p-Aminobenzoesäure. Hoppe-Seylers Z. **274**, 1942. 48.
3. — —: p-Aminobenzoyl-l-glutaminsäure, ein gegen Sulfonamide wirksameres Derivat des Vitamin H'. Versuche an *Streptobacterium plantarum*. Hoppe-Seylers Z. **277**, 1943. 197.
4. — —: Über die Bedeutung der Folinsäure für die Sulfonamidresistenz. Hoppe-Seylers Z. **283**, 1948. 195.
5. Bauch, R.: Sulfonamide und Colchicin. Ein botanischer Beitrag zum Sulfonamidproblem. Pharmazie **4**, 1949. 1.
6. Bell, E. A., Cocker, W. and O'Meara, R. A. Q.: The intracellular mode of action of the sulphonamide derivatives. Some condensation products of reductone. Biochem. Journ. **45**, 1949. 373.
7. Blanchard, K. C.: The isolation of p-aminobenzoic acid from yeast. Journ. Biol. Chem. **140**, 1941. 919.
8. Blauw Sing, T.: Acquired resistance to fatty acids and sulfanilamide of certain Trichophyton strains. Dermatologica **99**, 1949. 230.
9. Bonner, J.: A reversible growth inhibition of isolated tomato roots. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **28**, 1942. 321.
10. Brücke, F. und Kaindl, F.: Über die Glucoseassimilation durch Saccharomyces unter dem Einfluß von Sulfonamiden und von p-Aminobenzoesäure. Wiener klin. Wochenschr. 1947. 366.
11. Chapman, R. A.: Relation of specific chemotherapeutants to the infection court. Phytopath. **41**, 1951. 6.

12. Dimond, N. S.: p-Aminobenzoic acid prevents the growth inhibitory action of sulfanilamide. Science N. S. **94**, 1941. 420.
13. — — and Thompson, K. W.: The effect of sulfonamide drugs on Trichophytons in vitro. J. Invest. Dermat. **5**, 1942. 397.
14. Domagk, G.: Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. Angew. Chemie **48**, 1935. 657.
15. Eigsti, O. J.: A preliminary study of the effects of certain organic substances upon cell division. (Abstr.) Amer. J. Bot. **27**, 1940.
16. Emerson, S.: Growth responses of a sulfonamide-requiring mutant strain of Neurospora. J. Bact. **54**, 1947. 195.
17. — — and Cushing, J. E.: Altered sulfonamide antagonism in Neurospora. Fed. Proc. **5**, 1946. 379.
18. Erdos, J.: Über die fungizide Wirkung einiger Kupferaethylen-diamin-sulfonamidkomplexe. Experientia **6**, 1950. 343.
19. Fildes, P.: Lancet **238**, 1940. 935. (n. Rudolph).
20. Forrest, H. S. and Walker, J.: Reductone and the synthesis of Pteridines. Nature **161**, 1948. 721.
21. Fourneau, E., Tréfouel, J. et Mme., Nitti, F. et Bovet, D.: Action du para-aminophénylsulfamide sur les moissures. Cpt. Rend. Soc. Biol. Paris 1936. 652.
22. Fries, N. and Anna Panders: The growth-inhibiting effect of 5-amino-7-hydroxytriazolopyrimidine in fungi and its reversal by purines. Ark. Bot., 2. Ser., **1**, 5, 1951. 437.
23. Gäumann, E.: Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel 1951.
24. Gassner, G. und Hassebrauk, K.: Untersuchungen zur Frage der Getreiderostbekämpfung mit chemischen Mitteln. Phytopath. Z. 7, 1936. 427.
25. Grace, N. H.: Note on sulphanilamide and other chemicals that act as plant growth promoting substances. Canad. Journ. Res. **16** C, 1938. 143.
26. Hartelius, V.: Antivitamin effect of sulfanilamide on *Aspergillus niger*. Cpt. Rend. Trav. Labor. Carlsberg, Sér. Physiol. **24**, 1946. 178.
27. — — and Roholt, K.: Antivitamin effect of sulfonamide on *Saccharomyces cerevisiae*. Ibid. **24**, 1946. 141.
28. — — and Roholt, K.: Effect of Marfanil on *Streptobacterium plantarum, Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. Ibid. **24**, 1946. 163.
29. Hassebrauk, K.: Weitere Untersuchungen über Getreiderostbekämpfung mit chemischen Mitteln. Phytop. Z. **11**, 1938. 14.
30. — —: Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. I. Die Beeinflussung des Fruktifikationsvermögens. Ibid. **17**, 1951. 384.
31. — —: Untersuchungen über die Einwirkung usw. II. Weitere Untersuchungen über die rosthemmende Wirkung. Ibid. 1952.
32. Hindmarsh, Mary M.: Effect of sulphanilamide and p-aminobenzoic acid on mitosis. Nature **163**, 1949. 610.
33. Hulea, A.: Contributions à la connaissance des champignons commensaux des Uredinées. Bull. Sect. Scient. Acad. Roum. **22**, 1939.
34. Keeney, E. L., Ajello, L. and Elsie Lankford: Studies on common pathogenic fungi and on Actinomyces bovis. II. In vitro effect of sulfonamides. Bull. John Hopkins Hosp. **75**, 1944. 393.
35. Koelzer, P. und Giesen, J.: Aufhebung der bakteriostatischen Kraft der Sulfanilamide durch Para-Aminosalicylsäure (PAS). Naturwiss. **37**, 1950. 476.
36. Kuhn, R.: Vitamine und Arzneimittel. Chemie **55**, 1942. 1.
37. — —, Möller E. F. und Wendt, G.: Über 4,4'-Diaminobenzil und seine Einwirkung auf Bakterien. Ber. Chem. Ges. **76**, 1943. 405.
38. — —, Möller, E. F., Wendt, G. und Beinert H.: 4,4'-Diaminobenzophenon und andere schwefelhaltige Verbindungen mit Sulfonamidwirkung. Ber. Chem. Ges. **75**, 1942. 711.
39. — — und Schwarz, K.: Isolierung des Wuchsstoffes H' aus Hefe. Ber. Chem. Ges. **74**, 1941. 1617.

40. Lampen, J. O., Helen L. Baldwin and Peterson, W. H.: The synthesis of Para-Aminobenzoic acid by yeast. Arch. Biochem. 7, 1945, 277.
41. — — and Jones, M. J.: The growth-promoting and antisulfonamid activity of p-aminobenzoic acid, pteroylglutamic acid, and related compounds for *Lactobacillus arabinosus* and *Streptobacterium plantarum*. Jour. Biol. Chem. 170, 1947. 133.
42. Landy, M. and Dorothy M. Dicken: Neutralization of sulphonamide inhibition of yeast growth by p-aminobenzoic acid. Nature 149, 1942. 244.
43. Lewis, G. M. and Mary E. Hopper: Effect of sulfanilamide and its derivatives on fungi. Preliminary in vitro experiments. Arch. Dermat. and Syphil. 44, 1941. 1101.
44. Lwoff, A., Nitti, F., Mme Tréfouel, et Mlle Hamon, V.: Recherches sur le sulfamide et les antisulfamides. I. Action du sulfamide sur le Flagellé Polytomella caeca. II. Action antisulfamide de l'acide p-Aminobenzoique en fonction du pH. Ann. Inst. Pasteur 67, 1941. 9.
45. Macht, D. I. and Kehoe, D. B.: Effect of aminobenzoic acids and sulphanilamide on Lupinus seedlings. Fed. Proc. Amer. Phys. Soc. 2, 1943. 30.
46. Mangenot, G. et Mlle S. Carpentier: Action du p-aminophénylsulfamide et de l'acide p-aminobenzoique sur les végétaux supérieurs. Cpt. Rend. Soc. Biol. Paris 135, 1941. 1053.
47. — — et Mlle S. Carpentier: Effets produits, sur des végétaux supérieurs, par l'acide Indol-ß-acétique agissant en synergie avec le p-Aminophénylsulfamide ou l'acide p-Aminobenzoique. Ibid. 135, 1941. 1057.
48. Mehra, P. N.: Effect of sulfanilamide on mitotic division in pollen grains of Ephedra. Bot. Gaz. 111, 1949. 53.
49. Meyer, Helene: Über den Einfluß von Cadmium auf die Krankheitsbereitschaft des Weizens für *Erysiphe graminis tritici* Marchal. Phytopath. Z. 17, 1950. 63.
50. Mirimanoff-Olivet, M. et Mme.: Sulfamidés, vitamin H' et champignons. Pharmaceut. Act. Helvet. 17, 1942. 211.
51. Mitchell, J. E., Hotson, H. H. and Bell, F. H.: The use of sulfanilamide derivatives as eradicant fungicides for wheat stem rust. (Abstr.) Phytopath. 40, 1950. 873.
52. Möller, E. F. und Schwarz, K.: Der Wuchsstoff H', ein Antagonist der Sulfonamide bei *Streptobacterium plantarum* (Orla-Jensen); Wachstum von *Streptobacterium plantarum* in Nährlösungen aus chemisch genau definierten Verbindungen. Ber. Chem. Ges. 74, 1941. 1612.
53. Nickerson, W. J.: Biology of pathogenic fungi. Waltham, Mass., U.S.A. 1947.
54. Noojin, R. O. and Callaway, J. L.: Action of sulfonamide compounds on *Blastomyces dermatitidis* in vitro. Arch. Dermat. and Syphil. 47, 1943, 620.
55. — — and Callaway, J. L.: Effectiveness in vitro of sulfonamide compounds on Sporotrichum Schencki. Report of five cases of Sporotrichosis in North Carolina. Ibid. 49, 1944. 305.
56. Ratner, S., Blanchard, M., Coburn, A. F. and Green, D. E.: Isolation of peptide of p-aminobenzoic acid from yeast. Jour. Biol. Chem. 155, 1944. 689.
57. Roholt, K.: Effect of benzoic acid and benzoic acid derivatives on the growth of *Streptobacterium plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. Cpt. Rend. Trav. Labor. Carlsberg, Ser. Physiol. 24, 1946. 172.
58. Rubbo, S. D. and Gillespie, J. M.: Para-aminobenzoic acid as a bacterial growth factor. Nature 146, 1940. 838.
59. Rudolph, W.: Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe. Bern 1948.
60. Schopfer, W. H.: Sulfamides et acides nucleiques. Experientia 2, 1946. 188.
61. — — und Anker, W.: Wirkung von Sulfonamiden und Antisulfonamiden auf das Wachstum von Pisum-Wurzeln in steriler Organkultur. Ibid. 5, 1949. 117.
62. Senturia, B. H. and Wolf, F. T.: Treatment of external otitis. II. Action of sulfonamide compounds on fungi isolated from cases of otomycosis. Arch. Otolaryngol. 41, 1945. 56.
63. Spencer, L.: Sulfanilamide and plants. Chron. Botan. 6, 1941. 318.

64. Stamp, T. C.: Bacteriostatic action of sulphanilamide in vitro. The Lancet **2**, 1939. 10.
65. Stoll, R.: Actions du Para-aminobenzène Sulfamide et de l'acide Para-aminobenzoique sur le développement d'Allium cepa. Cpt. Rend. Soc. Biol. Paris **137**, 1943. 170.
66. Tatum, E. L. and Beadle, G. W.: Genetic control of biochemical reactions in Neurospora and „aminobenzoicless" mutant. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **28**, 1942. 134.
67. — — and Giese, A. C.: Sulfanilamide and respiration of Neurospora. Arch. Bioch. **9**, 1946. 15.
68. Traub, H. P.: Effect of sulfonamide and other sulfa compounds on nuclear condition in plants. Journ. Heredity **32**, 1941. 157.
69. Tréfouel, J. et Mme. J., Nitti, F. et Bovet, D.: Activité du p-aminophénylsulfamide sur les infections streptococciques expérimentales de la souris et du lapin. Cpt. Rend. Soc. Biol. Paris **120**, 1935. 756.
70. Tschesche, R.: Eine neue Deutung des antibakteriellen Wirkungsmechanismus der Sulfonamide. Z. Naturf. **2 b**, 1947. 10.
71. — — und Gertrud Cremer-Bartels: Zur Frage des antibakteriellen Wirkungsmechanismus der Sulfonamide. VI. Beeinflussung der Sulfonamidempfindlichkeit von Enterokokken und E. coli durch 2-Amino-6,9-dioxy-pterinaldehyd-(8), Aminosäuren und Wuchsstoffe. Ibid. **5 b**, 1950. 367.
72. — —, Loop, W. und Soehring, K.: Zur Frage des antibakteriellen Wirkungsmechanismus der Sulfonamide. Ibid. **3 b**, 1948. 298.
73. Voderberg, Käthe: Zum Nähr- und Wirkstoffbedarf von *Coprinus lagopus*. Ibid **3 b**, 1948. 272.
74. Wiedling, S.: Antagonism between sulphanilamide and p-aminobenzoic acid in Pisum. Naturwiss. 1943. 114.
75. Wolf, F. T.: The action of sulfonamides on certain fungi pathogenic to man. Mycologia **38**, 1946. 213.
76. Woods, D. D.: The relation of p-aminobenzoic acid to the mechanism of the action of sulphanilamide. Brit. Journ. Exp. Path. **21**, 1940. 74.
77. — — and Fildes, P.: The antisulphonamide activity (in vitro) of p-aminobenzoic acid and related compounds. Chem. and Ind. **59**, 1940. 133.
78. Wortmann, F.: Dermatomykosen. Dermatologica, Basel, **95**, 1947. 175.

*Aus dem Institut für Pflanzenkrankheiten der Universität in Bonn*
*Direktor: Professor Dr. H. Braun*

# Untersuchungen zur Rettichschwärze und zur Biologie ihres Erregers *Aphanomyces raphani* Kendr. im Vergleich mit weiteren *Aphanomyces*-Arten

Von

F. Herold

*Mit 25 Abbildungen*

Inhalt: A. Einleitung. Zur Geschichte und wirtschaftlichen Bedeutung der Krankheit. — B. I. Beobachtungen zur Symptomatik der Krankheit. — II. Untersuchungen zur Biologie von *A. raphani*. — 1. Isolierung des Erregers der Rettichschwärze; a) verschiedenes Ausgangsmaterial, b) Variation der Nährböden, c) unterschiedliche Desinfektions- und Isolierungsmethodik. — 2. Reinigung von *A. raphani* und anderen *Aphanomyces*-Arten; a) verschiedene Nährböden, b) Variation der Temperatur, c) Zusatz von Bakteriziden, d) Passage über den Wirt, e) unterschiedliche Technik. — 3. Verhalten von *A. raphani* in Reinkultur und Vergleich mit anderen *Aphanomyces*-Arten; a) Wuchsform und -geschwindigkeit auf festen Nährböden, b) Wuchsform und -geschwindigkeit in flüssigen Medien, c) Bildung der Fortpflanzungsorgane, d) Keimung der Oosporen, e) Beobachtungen bei Myzelübertragungen. — 4. Verhalten des Pilzes im natürlichen Wirt; a) Infektion und Überwinterung, b) vegetatives Wachstum, c) Bildung der Sexualorgane. — III. Untersuchungen über die Abhängigkeit des Auftretens der Krankheit von Umweltbedingungen. — 1. Methodisches; a) Bodenverseuchungen, b) Beimpfung steril angezogener Sämlinge, c) Infektionsversuche an Blättern, d) Infektionen an wachsenden Knollen, e) Impfungen auf Rettichscheiben. — 2. Der Einfluß der Borversorgung auf das Auftreten der Rettichschwärze. — 3. Der Einfluß des Bodens auf das Auftreten der Rettichschwärze; a) Bodenart, b) Bodenfeuchtigkeit, c) Bodentemperatur, d) Mineralsalzdüngung. — 4. Der Einfluß des Wirtes auf das Auftreten der Rettichschwärze. — IV. Untersuchungen zur Bekämpfung der Rettichschwärze. — 1. Kulturmaßnahmen. — 2. Samenbeizung. — 3. Sorten. — C. Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

## A. Einleitung. Zur Geschichte und wirtschaftlichen Bedeutung der Krankheit

Der erste Bericht über diese „ernste Krankheit der Rettiche" ist 1912 (Barret) in den USA erschienen. Jedoch herrschen hier wie auch in der nächsten Abhandlung aus dem Jahre 1915 (Edson) noch unklare Vorstellungen über ihren Erreger. Während Barret ihn als *Aphanomyces laevis* ansieht, ordnet Edson ihn als *Pythium aphanidermatum* ein.

In den folgenden Jahren sind außer einer kurzen Notiz (Link and Gardner) über ihre beachtliche Bedeutung für den Markt keine Angaben zu der Krankheit zu finden. 1927 veröffentlichte Kendrick seine grundlegende Arbeit über die Rettichschwärze. Neben der endgültigen Identifizierung des Erregers bringt sie eine eingehende Symptomatik, Angaben zur Biologie des Pilzes und solche über den unterschiedlichen Befall der Sorten.

Die cytologischen Verhältnisse von *A. raphani* bei der Bildung von Zoo- und Oosporen wurden bald darauf (1929) von Drechsler studiert.

1938 meldet Conners das Neuauftreten der Krankheit in Canada.

In Deutschland hat Böning 1932 erstmalig über das Schwarzwerden der Rettiche berichtet. Er stellte fest, daß die Krankheit in weiten Bezirken Südbayerns vorkommt. Jedoch halten sich seine Ausführungn eng an Kendricks Abhandlung und bringen somit keine neuen Erkenntnisse. 1935 erschien eine Erweiterung dieser Arbeit, die über Bekämpfungsversuche durch Bodendesinfektion und Düngung berichtet.

In neuester Zeit hat Zattler eine Einschränkung des Krankheitsbefalls durch Saatgutbeizung gemeldet.

Der wirtschaftliche Schaden durch die Rettichschwärze wird von Böning (1949) mit rund 0,5 Millionen DM jährlich angegeben, wobei die Qualitätsminderung durch leichte Erkrankung noch nicht berücksichtigt ist.

Nach eigenen schriftlichen Erkundigungen bei Stuttgarter Gärtnern wird ein Schwärzebefall von 10 % als erträglich angesehen. Oft steigt er aber auf 50 bis 60 % und auch auf 70 bis 80 % an. Ein weiterer Gärtner teilte mit, daß er den Rettichanbau vollständig eingestellt habe, weil die Erträge durch den Schwärzeausfall nicht mehr lohnten.

Die Verbreitung der Rettichschwärze in Deutschland scheint zur Zeit noch nicht über die von Böning angegebenen bayrischen Bezirke hinausgeschritten zu sein. So weisen Erkundigungen an Pflanzenschutzämtern und bei Gärtnern in Westfalen und im Rheinland sowie an verschiedenen rheinischen Gemüsebauschulen darauf hin, daß die Krankheit in diesen Gebieten noch nicht beobachtet wurde.

Schon aus der geringen Zahl der Veröffentlichungen über die Rettichschwärze läßt sich entnehmen, daß ihre Erforschung noch in den Anfängen steht. Ein genaues Studium dieser Abhandlungen führte bald zu der Erkenntnis, daß die wenigen Angaben recht lückenhaft und oft nur auf Vermutungen gestützt sind. Daher war es die Aufgabe der vorliegenden Arbeit, zur Klärung der Biologie des Erregers und wesentlicher Faktoren beim Zustandekommen der Krankheit beizutragen und dadurch Anhaltspunkte für ihre Bekämpfung zu gewinnen.

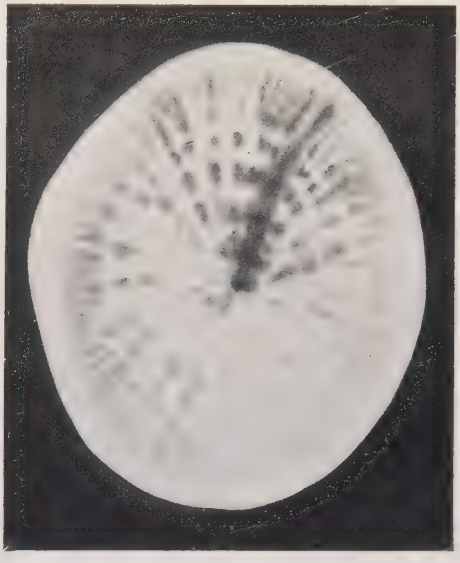
Abb. 1. Bleigraue, bandartige Befallsstellen an der Knolle, das Laub vollständig gesund

Abb. 2. Risse und Einschnürungen an der Knolle

## B. I. Beobachtungen zur Symptomatik der Krankheit

Die Schwärze tritt in erster Linie an Wurzelverdickungen der Rettiche auf. Äußerlich sieht man unter den epidermalen Schichten bleigraue bis blauschwarze Verfärbungen, die meist in Gestalt von mehr oder weniger breiten Bändern die Knolle umziehen (Abb. 1).

Links:
Abb. 3. Vollkommen verwachsener und geschwärzter Rettich



Rechts:
Abb. 4. Querschnitt durch einen kranken Rettich. Die bevorzugte Ausbreitung des Pilzes in den Markstrahlen ist deutlich zu erkennen

Da die befallenen Gewebe nicht mehr teilungsfähig sind, kommt es bei weiterem Wachstum zu Rissen und Einschnürungen an den Wurzeln bis zu völliger Mißgestaltung der Rettiche (Abb. 2, 3).

Im Innern breitet sich der Pilz in radialer Richtung, meist den Markstrahlen folgend, aus (Abb. 4). Dabei wird das Gewebe braun bis schwarz verfärbt, behält zunächst seine normale Festigkeit und geht später in eine Trockenfäule über. Weder auf Geruch noch Geschmack ist ein Einfluß festzustellen.

Oft ist äußerlich nur eine unscheinbare Infektionsstelle sichtbar, während in der Knolle eine starke Ausbreitung des Erregers bis einige Millimeter vor der kambialen Zone stattgefunden hat (Abb. 5, 5 a).

Gelegentlich ist von einer ehemaligen Knolle nur noch ein Zylinder von Leitbündeln um eine torfartig zersetzte Substanz übriggeblieben (Abb. 6).

Bei einer weiteren Erscheinungsform der Krankheit bleibt der Pilz nur auf eine äußere, 1 bis 2 mm tiefe Schicht beschränkt. An älteren Infektionsstellen dieser Art ist der Erreger abgestorben, hinterläßt eine dünne schorfartige Borke und bleibt nur an den Rändern solcher Flecken wachstumsfähig (Abb. 7, 7 a).

Abb. 5. Äußerlich nur ganz geringe Schaleninfektionen

Rechts: Abb. 5 a. Dieselbe Knolle im Längsschnitt, innen vollkommen geschwärzt, links scharf abgesetzte, unten allmählich ins Gesunde übergehende Befallszone

Abb. 6. Trockenfaul zersetzter Rettich

Sehr oft dringen nach dem ursprünglichen Erreger auch Bakterien und andere Mikroorganismen ein, die dann bald die ganze Knolle in eine übelriechende Naßfäule überführen.

Durch Beobachtung von Zwischenstufen ließ sich feststellen, daß die vollständig zersetzten Knollen mit den Gefäßbündelgehäusen (Abb. 6) nur ein fortgeschrittenes Stadium von bleigrauen Befallsstellen (Abb. 4) sind.

Weiterhin wird das jeweilige Krankheitsbild wesentlich von den Standortsbedingungen beeinflußt.

Sekundär bewirkte Naßfäule ist in erster Linie in feuchten Böden festzustellen.

Starke Ausbreitung im Innern bei einer äußerlich kaum wahrnehmbaren Infektionsstelle ist nur zu beobachten, wenn als Eintrittspforte für den Erreger die

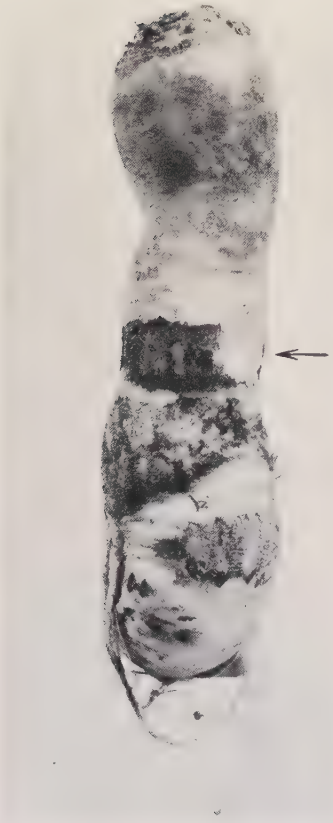


Abb. 7. Schaleninfektionen nur äußerlich, besonders deutlich an ← der angeschnittenen Stelle sichtbar

Abb. 7 a. Längsschnitt durch die gleiche Knolle, an den Randzonen sind die Befallsstellen kenntlich (die dunklen Stellen im Innern sind Fraßgänge der Rettichfliege)

Durchbruchswunde einer Nebenwurzel diente (Abb. 8). An dieser Bahn entlang gelangt der Pilz schnell zum Zentralzylinder und kann von dort aus sein eigentliches Zerstörungswerk beginnen.

„Schaleninfektionen" treten vorwiegend in dem Parasiten ungünstigen Böden auf, jedoch ist ein Zusammenhang mit der Vitalität des Erregers abzulehnen, da an der gleichen Wurzel oberflächliche und tief eingedrungene Erkrankungen auftreten. Auch stellte BÖNING (1935) fest, daß bei einer Hemmung des Pilzes im Boden einer einmal eingetretenen Infektion der Pflanze nicht mehr Einhalt geboten werden kann.

Eine Abhängigkeit der differenzierten Befallsformen von den Sorten besteht nicht. Ebensowenig sind sie auf das Vorkommen von biologischen Rassen des Pilzes zurückzuführen, da sie nebeneinander in den gleichen Kulturen und auch an demselben Rettich auftreten (Abb. 5 a). Damit ist auch ein Einfluß des Alters des Wirtes auf die Erscheinungsform der Krankheit ausgeschlossen.

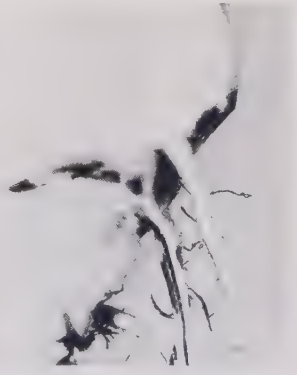


Abb. 8. An der Durchbruchswunde einer Nebenwurzel eingedrungenes und fortschreitendes Pilzmyzel

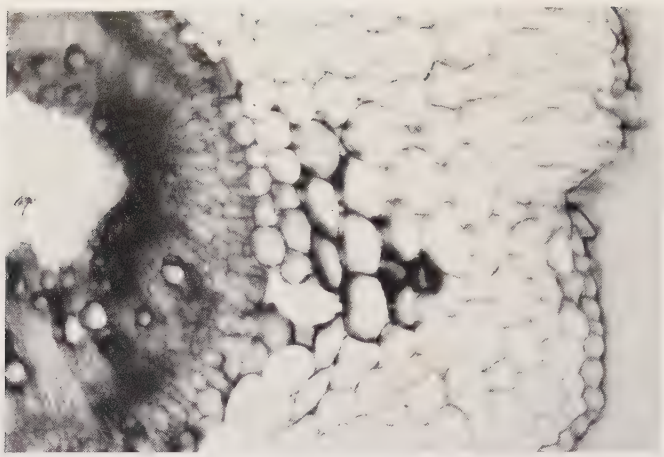


Abb. 9. Querschnitt durch das Hypokotyl eines Sämlings, nur im Rindenparenchym durch Pilzbefall geschwärzte Interzellularen

Abb. 10. Erkrankter Sämling. Der Pilz hat sich an einer Seite durch das Hypokotyl bis in das Keimblatt ausgebreitet

Die oberirdischen Teile älterer Pflanzen werden nicht befallen und lassen auch keine Symptome erkennen.

Sämlinge können nach Barret unter bestimmten, nicht näher bezeichneten Bedingungen befallen werden, und auch Kendrick berichtet über die Erkrankung junger Pflanzen.

Bei eigenen Aussaaten zahlreicher Sorten in Stuttgarter Boden und selbstverseuchten Sand (S. 109) traten in ersterem nur ganz vereinzelt, in letzterem jedoch in starkem Maße Sämlingsinfektionen auf. Nie jedoch waren die von Kendrick beschriebenen Laubblatterkrankungen zu beobachten, vielmehr blieb der Befall auf das Hypokotyl und die Keimblätter beschränkt (schwarze Strichel, dann glasiges Aussehen, schließlich Einschrumpfen. Vgl. S. 107).

Ein nach Jones bei Erbsen gegenüber anderen Wurzelparasiten charakteristisches Symptom für die Infektion mit *A. euteiches* wurde auch bei jungen Rettichen beobachtet: beim langsamen Ausreißen der Pflanzen brechen die Gefäße nicht direkt an der geschwärzten Stelle ab, sondern sie lassen sich noch ein Stück aus dem Boden ziehen. Dementsprechend konnte bei Querschnitten des Hypokotyls das Myzel immer nur im Rindenparenchym, nie im Zentralzylinder festgestellt werden (Abb. 9).

Der Erreger scheint an der Erdoberfläche nahe dem Übergang von der Wurzel zum Hypokotyl einzudringen, da bei kranken Sämlingen die unterirdischen Pflanzenteile noch vollkommen gesund sind, während im Hypokotyl der Pilz aufwärts wächst (Abb. 10, 11).

Abb. 11
Teil der Wurzel und des Hypokotyls: untere Wurzelabschnitte noch gesund, Mitte stark befallen, oben ← ← wenig schwarze Strichel

## II. Untersuchungen zur Biologie von *Aphanomyces raphani*

### 1. Isolierung des Erregers der Rettichschwärze

Die Isolierung von *A. raphani* wurde zunächst aus der kranken Wirtspflanze versucht. Dabei zeigte sich bald, daß hier die gebräuchlichen Verfahren nicht zum Ziele führten. Daher wurde die Frage der Übertragung des Parasiten in Reinkultur eingehender als üblich bearbeitet.

Schon aus vielen Literaturangaben ist ersichtlich, daß die Isolierung von *A.*-Arten oft auf besondere Schwierigkeiten stößt.

Edson mußte seine Forschungen über vermutete Zusammenhänge zwischen einer Zuckerrübenkrankheit und der Rettichschwärze einstellen, weil der Erreger *A. laevis* verlorengegangen war und nicht wieder beschafft werden konnte.

Peters (1913) schreibt in seiner Abhandlung über *A. laevis*, die Isolierung des Pilzes sei ihm mehrere Male gelungen, aber stets mit Schwierigkeiten verbunden.

Zur Neuentdeckung eines Schädlings aus der Gattung *Aphanomyces* sagt Jones (auf S. 297): „Die Tatsache, daß dieser bedeutende Erbsenparasit *(A. euteiches)* lange Zeit unbeschrieben blieb, ist zweifellos den Schwierigkeiten bei seiner Isolierung und Reinkultur zuzuschreiben."

Ebenso äußert Drechsler die Ansicht, daß die starke Verbreitung von *Phycomyceten* und ihr Vorherrschen bei Erkrankungen feiner Wurzeln lange Zeit vollkommen unbekannt oder kaum beachtet gewesen sei infolge des Fehlschlagens ihrer Reinkultur durch gewöhnliches Auslegen auf Nährböden.

Auch Kendrick weist auf beachtliche Schwierigkeiten bei der Isolierung von *A. raphani* hin.

Die eigenen Versuche blieben zunächst ohne jeden Erfolg. Deshalb suchte ich durch Variieren des Ausgangsmaterials, der Nährböden und der Methode eine Klärung für die negativen Isolierungsergebnisse herbeizuführen.

a) Verschiedenes Ausgangsmaterial

Anfangs standen nur die aus dem Stuttgarter Gebiet geschickten Rettiche, später auch Pflanzen aus selbstinfizierter Erde zur Verfügung. Die Wurzelknollen beider Herkünfte wurden in unterschiedlichen Krankheitsstadien und nach verschiedener Aufbewahrungszeit verwendet. Bei den am Versuchsort gezogenen Pflanzen konnte außerdem der Einfluß des Alters, der Sorte und des Bodens auf die Isolierungsfähigkeit des Erregers geprüft werden.

Sehr hinderlich erwiesen sich vor allem die im Wirt dem eindringenden Erreger bald folgenden Bakterien. Selbst Impfmaterial aus frischen Infektionsstellen wurde gewöhnlich von diesen überwuchert, so daß nur bei einem geringen Prozentsatz auswachsendes Myzel festzustellen war, immer mit Bakterien behaftet, meist so stark, daß Abimpfungen nicht möglich waren.

Eine weitere Ursache für das Mißlingen der Isolierungen ergab sich aus der genauen Betrachtung der Schnittflächen kranker Knollen: im allgemeinen vollzieht sich der Übergang vom gesunden zum kranken Gewebe in allmählicher Farbabstufung von hellerem zu dunklerem Grau bis zur vollständigen Schwärzung (Abb. 4, 5 a unten); gelegentlich ist aber auch eine scharfe Abgrenzung der kranken Teile gegenüber den weißen Partien festzustellen (Abb. 5 a linke Hälfte). Der Erreger ist nur aus Zonen des allmählichen Übergangs zu isolieren. Da bei den scharf abgesetzten Gewebepartien die Verunreinigung mit sekundären Organismen bedeutend verringert ist und gelegentlich ausbleibt, kann diese nicht die Ursache des negativen Erfolges sein. Die dunkle Färbung des Gewebes legt nahe, daß der Pilzbefall schon vor längerer Zeit stattfand und der Parasit dann zum Wachstumsstillstand kam. Es scheinen die Hyphen von *A. raphani* sich wie die von *A. euteiches* „nur kurze Zeit an einer bestimmten Stelle des Wirtes in einem aktiv vegetativen Stadium" zu befinden (Jones, auf S. 297).

Diese Annahme wird erhärtet durch die Beobachtung, daß in Wasser ausgelegte Rettichstücke — deutlicher als auf Agar gebrachte — Myzelauswuchs nur in dem äußeren Teil der grauen Zone bis zu einer Tiefe von 0,3, höchstens 0,6 mm zeigen; in den darunterliegenden dunklen Schichten ist der Pilz nicht mehr zum Wachstum zu bringen, auch wenn dort kein stärkerer Bakterienbefall vorliegt. Der kräftigste Myzelauswuchs findet in der gesund erscheinenden 2 mm breiten Zone vor der Verfärbung statt.

Aus Rettichen, die bei sommerlichen Temperaturen gelagert werden mußten, ließ sich nach zwei bis drei Wochen je nach den Außenbedingungen infolge der fortschreitenden Bakterienentwicklung oder der Austrocknung der Pilz nicht mehr isolieren. Um festzustellen, inwieweit hier die Tempe-

ratur und in welchem Maße der Feuchtigkeitsgehalt des Wirtsgewebes eine Rolle spielen, wurden gewogene Knollenteile von demselben Rettich in geschlossenen Zylindern über Wasser und über Kalziumchlorid aufbewahrt, bis die letzteren eine den frei im Keller gelagerten Rettichen ähnlich zähweiche Konsistenz bekommen hatten. Diese Stücke aus den Kalziumchlorid enthaltenden Gefäßen zeigten bei einem Gewichtsverlust von 43 % keinen Myzelauswuchs mehr, während bei ebensolange über Wasser gelagerten Teilen nur eine 3 %ige Gewichtsabnahme festzustellen und *A. raphani* zu isolieren war. Bei normalen Wärmegraden scheint also das Pilzmyzel mehr durch Austrocknen als durch bakterielle Zerstörung abzusterben; in feuchten Geweben können die Hyphenspitzen weiterwachsen und dadurch entwicklungsfähig bleiben.

Ein Einfluß der Wachstumsphase kranker Rettiche auf das Gelingen der Isolierungen war nicht festzustellen.

Die Infektionsart und das Krankheitsstadium sind nur insofern von Bedeutung als extremes Material mit nur ganz geringen Schaleninfektionen oder mit Totalbefall keinen Erfolg verspricht.

Ob krankes Stuttgarter Material oder selbstinfizierte Pflanzen verwendet wurden, blieb bei Beachtung der Lagerzeit und -temperatur ohne Einfluß auf das gewünschte Ergebnis.

Kendrick erhielt einen höheren Prozentsatz erfolgreicher Isolierungen von Pflanzen aus sterilisierter und dann beimpfter Erde als von solchen aus nicht sterilisiertem natürlich verseuchtem Boden. Eigene Prüfungen (S. 114) ergaben demgegenüber weder bei der Ausbildung der Symptome noch bei den Isolierungen Unterschiede zwischen den Rettichen aus desinfiziertem und denen aus nicht desinfiziertem Boden.

Die Feststellung entspricht den vorangegangenen Überlegungen; denn während der drei- bis viermonatigen Entwicklungszeit der Pflanzen muß jegliche Bodensterilisation aufgehoben sein, und eine Vergesellschaftung des Pilzes mit nur in unbehandeltem Boden vorkommenden Bakterien ist deshalb nicht anzunehmen und nach den eigenen Versuchen (S. 106) mit Sicherheit abzulehnen.

Weiter gelangen Kendrick Isolierungen leicht aus Blättern und Blattstielen. Jedoch konnte diese Erkrankungsform nicht beobachtet werden, während die Stiele der Kotyledonen bei sichtbaren Befallserscheinungen meist derart angewelkt waren, daß sie sich zu Isolierungen nicht mehr verwenden ließen. Auch kranke Blattpartien einzelner in Röhrchen angezogener und infizierter Pflanzen (S. 110) zeigten keine besseren Erfolge.

Aus dem Hypokotyl von Sämlingen wuchs bei frischen Befallsstadien der Pilz aus, jedoch mit gleich starker Bakterienverunreinigung wie bei Knollenstücken.

Es ergibt sich also, daß in den untersuchten Fällen die Beschaffenheit des Ausgangsmaterials auf den Isolierungserfolg starken Einfluß ausübt, während die Herkunft der Rettiche ohne Bedeutung ist.

Schließlich wurde noch die Kultur des Pilzes direkt aus verseuchtem Boden versucht (nach Remy).

In Petrischalen wurde wenig Stuttgarter Erde ungefähr 1 cm hoch mit sterilem Wasser überschichtet und 15 Minuten gekochter Leinsamen als „Köder" hinzugefügt (aufgestellt im Dunkeln, um Algenentwicklung zu vermeiden).

Vom dritten Tage an durchgeführte mikroskopische Kontrollen dieser „Köder" zeigten unseptierte und später auch septierte Pilzhyphen, nie jedoch die für *A. raphani* typischen Zoosporen. Daher wurde diese Methode nach dreimaligem Durchführen (je drei Parallelkulturen) nicht weiter angewandt.

b) Variation der Nährböden

Die vielfältigen Mißerfolge der Isolierungsversuche, indem entweder austretende Hyphen gleich eingingen oder von Bakterien überwuchert wurden oder gelegentlich auch Impfstücke steril blieben, obgleich der Pilz mikroskopisch in ihnen nachzuweisen war, legten den Gedanken nahe, durch besondere Zusammensetzung des Nährbodens die Entwicklungsbedingungen des Pilzes zu verbessern und damit gleichzeitig die Bakterienvermehrung zu hemmen. Behält doch auch im Rettich, wo dieser selbst das Nährmedium darstellt, normalerweise das Myzel einen Vorsprung vor den Folgeorganismen. Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, daß diese Begünstigung des Hyphenwachstums im natürlichen Nährsubstrat eben durch die dem Erreger besonders angepaßten artspezifischen Bedingungen der lebenden Pflanze bewirkt wird. In diesem Falle wäre kaum durch eine Veränderung des Nährbodens die gewünschte Förderung zu erreichen.

Kendrick führte seine Isolierungen auf Kartoffel- oder Kartoffeldextroseagar durch. Die eigenen Versuche mit diesem Medium (nach Reinking, s. S. 98) waren aber meist derart mit Bakterien verunreinigt, daß der Pilz nicht abgeimpft werden konnte.

Jones benutzte zur Isolierung von *A. euteiches* 2- bis 3 %igen Wasseragar. *A. raphani* wächst aber auf diesem Nährboden nur sehr schwach (vgl. S. 93), so daß das Versagen dieses Mediums in Konkurrenz mit dem natürlichen Substrat verständlich erscheint.

Weitere *A.*-Arten *(A. cochlioides, A. cladogamus, A. camptostilus)*, unter diesen auch *A. raphani*, brachte Drechsler (1929) auf Maismehlagar aus der Wirtspflanze in Reinkultur. Eigene Isolierungsversuche auf diesem Substrat führten gelegentlich zum Erfolg. Als besser geeignet erwies sich Hafermehlagar (zur Beobachtung der zarten Pilzhyphen filtriert). Festere Konsistenz des Nährbodens verringerte die Bakterienvermehrung um weniges. Deshalb wurde zu 1000 g Wasser 20 bis 30 g Agar und 10 g Knorrs Hafermehl gegeben.

Um die Isolierungen erfolgreicher und sicherer zu gestalten, prüfte ich weitere Möglichkeiten zur Verbesserung der Nährböden. Ansäuern von Hafermehlagar mit 2,5 %iger Milchsäure auf pH 4,8 und pH 4,2 brachte keine Fortschritte.

Auf einem von Höhnk (ref. Richter) zur Kultur von Boden-*Phycomyceten* benutzten Nährboden[1]) ließ sich eine deutliche Hemmung der Bakterienentwicklung feststellen, aber das Pilzwachstum war auch stark verzögert, so daß kein zu Abimpfungen ausreichender Abstand von den Verunreinigungen zustande kam.

Nachdem Reinkulturen von *A. raphani* auf X-Agar (S. 96) eine besonders üppige Entwicklung gezeigt hatten, wurde auch dieses Substrat in die Isolierungsversuche einbezogen. Es zeigte sich aber, daß bei dem Peptongehalt von 0,3 % eine starke Bakterien-, nie jedoch Hyphenentwicklung eintrat.

Entsprechend mehrfachen Literaturangaben (Kasanowsky, Peters, Niethammer) lassen sich *A.*-Arten gut in flüssigen Medien kultivieren. Auch Kendrick zog *A. raphani* in Abkochungen von Rettichblättern oder Erbsen. In eigenen Versuchen in diese Substrate ausgelegte Stücke zeigten zwar einen Austritt von Hyphen, jedoch wurden diese in wenigen Tagen wieder von Bakterien zersetzt. Ebenso trat in Hefewasser (0,5 und 1 %) eine starke Trübung ein.

Eine eiweißfreie Nährflüssigkeit, Petrilösung[2]), ermöglichte, wie auch klares Wasser, das Auswachsen von Hyphen und oft auch Zoosporenbildung, aber das Myzel erreichte höchstens eine Länge von 3 mm und war dann nach 10 bis 15 Tagen nicht mehr sichtbar. Ein Zusatz von 1 % Saccharose verbesserte die Ergebnisse nicht.

Die Verwendung verschiedenster Nährböden führte somit zu keinem günstigeren Isolierungserfolg.

c) Unterschiedliche Desinfektions- und Isolierungsmethodik

Da sich im Laufe der experimentellen Arbeit gezeigt hatte, daß die Fehlschläge der Isolierung neben den biologischen Eigenschaften des Erregers vor allem durch die ihm rasch folgende Bakterienflora bedingt sind, sollte versucht werden, durch Abwandlung der Desinfektions- und Isolierungsmethode dieser Schwierigkeiten Herr zu werden.

Drechsler (1938) weist zur Isolierung von *Phycomyceten* besonders darauf hin, daß bei der Abtötung von sekundär in den Wirt eingedrungenen Organismen vor allem darauf zu achten ist, durch solche Verfahren nicht auch gleichzeitig den eigentlichen Krankheitserreger schädlich zu beeinflussen.

---

[1]) 6 — 7,5 g Agar } gewässert und in 1 Liter Wasser gekocht dem filtrierten
6 — 7,5 g Carrageen *) } Schleimmittel zugefügt:
0,5 g Traubenzucker } in 150 ccm Wasser aufgelöst
0,5 g Zitronensäure }
20 ccm einer Lösung, die auf 400 ccm Wasser enthält:
2 g $KH_2PO_4$, 0,1 g $NH_4NO_3$, 0,1 g $(NH_4)_2SO_4$, 0,1 g $MgSO_4$

*) Carrageen ist ein Extrakt einer Rotalge, da dieser nicht erhältlich war, wurde er durch ausgefaulten Agar ersetzt.

[2]) 0,2 g $CaNO_3$
0,08 g $KH_2PO_4$
0,08 g $MgSO_4$
0,03 g KCl
0,01 g $FeSO_4$
1000 ccm Wasser

Nach Jones ist *A. euteiches* gegen Quecksilbersublimat besonders empfindlich. Für *A. raphani* scheint diese Feststellung auch zuzutreffen, denn nach kurzem Eintauchen kleiner Rettichscheiben in 0,1 %ige Sublimatlösung und sofortigem Auswaschen in sterilem Wasser unterblieb jegliches Wachstum.

Daraufhin wurde an Rettichstückchen, die 60, 30 und etwa 5 Sekunden im gleichen Desinfektionsmittel gebadet und anschließend ausgewaschen waren, die Quecksilberkontrolle mittels überströmender Schwefeldämpfe durchgeführt. Die eine Minute behandelten Stückchen zeigten stets die beim Quecksilbernachweis auftretende Schwärzung. Nach den kürzeren Behandlungszeiten erfolgte die Farbreaktion bei jungen Geweben teilweise und dann fleckenartig, bei älteren, weniger benetzungsfähigen Stücken unterblieb sie.

Eine Reinigung des Impfmaterials durch mehrmaliges Schütteln in sterilem Wasser brachte keine ausreichende Bakterienbeseitigung.

Von diesen Gesichtspunkten aus wurde dann der folgende Arbeitsgang entwickelt. Kleine Rettichstücke ($1^1/_2 \times 1^1/_2 \times 2$ cm) wurden in 0,1 %iges Sublimat getaucht, sofort unter fließendem Leitungswasser abgewaschen, in sterilem Papier eingehüllt zum Arbeitsplatz gebracht und dort mit abgeflammtem Messer von den kleinen Quadern allseitig eine 2 mm dicke Schicht abgeschnitten. Dadurch ist mit Sicherheit jede Sublimatspur entfernt. Das Reststück wurde in Reagenzröhrchen mit sterilem destilliertem Wasser geschüttelt, in sterilem Filtrierpapier getrocknet und unter dem zur Hälfte aufgedeckten Papier in Scheiben zerschnitten, von denen dann die mittleren zum Auslegen geeignet waren.

Nach dem Schütteln im sterilen Wasser ohne Zerschneiden direkt auf Agar gebrachte große Impfstücke zeigten eine auffallend stärkere Bakterienverunreinigung und keine Pilzhyphen.

Ein vereinfachtes Desinfektionsverfahren durch Eintauchen in Alkohol und Abflammen erwies sich als unzweckmäßig.

Zur Isolierung wurden verschiedene Verfahren geprüft. In Anlehnung an die Methode von Peters (1911) und Drechsler (1929) wurde das Impfmaterial in halb mit Wasser gefüllte, watteverschlossene, sterilisierte Reagenzröhrchen gebracht, und wenn nach zwei bis vier Tagen zarte Hyphen zu erkennen waren, das Rettichstückchen mit dem Pilzrasen in sterilem Filtrierpapier getrocknet und auf Nährboden übertragen.

In einigen Fällen gelang die Isolierung von *A. raphani* nach diesem Verfahren. Meist aber setzte nach dem Überimpfen auf Agar nur Bakterienentwicklung ein, oder die Kultur blieb steril.

Durch Ansäuern des Wassers mit 2,5 %iger Milchsäure oder n/HCl auf pH 4,8 und pH 4,2 schien der Hyphenauswuchs kaum gehemmt zu sein; jedoch traten beim Überimpfen auf Agar wieder die gleichen Schwierigkeiten auf. Ein Übertragen des Rettichstückchens mit dem Myzel oder auch nur des vorsichtig abgelösten Myzels in Nährflüssigkeiten ließ dieses auch bald einer starken Bakterienentwicklung erliegen.

So wurde ein weiteres Verfahren (Plakidas) geprüft: Kleinste Gewebestückchen ($0{,}5 \times 0{,}3 \times 0{,}2$ mm) werden im hängenden Tropfen an

Deckgläschen in kleine sterile, feuchte Kammern gebracht, nach 24 bis 48 Stunden mikroskopisch kontrolliert und diejenigen, die Myzel zeigen, auf Agar übertragen. Durch die geringe Größe des Impfmaterials soll die Wahrscheinlichkeit einer Bakterienbesiedlung stark verringert sein.

In den eigenen Versuchen wurden nicht ganz so kleine Ausgangsstückchen verwendet und in einer weiteren Reihe anstatt des Wassertropfens Hafermehlagar unter das Deckglas gebracht. Es konnte aber in keiner der 16 Kammern Myzelwachstum festgestellt werden, während von 17 Kontrollen mit Ausgangsstücken normaler Größe (10 × 7 × 2 mm, zur Hälfte auf Hafermehlagar und zur Hälfte in Wasser) 11 die übliche Pilz- und Bakterienentwicklung zeigten. Bei Abbruch des Versuches nach einem Monat waren einige der kleinen Gewebsteilchen noch vollkommen unverändert und ließen intrazellular die Pilzhyphen erkennen, andere waren zersetzt und enthielten Oosporen (s. auch S. 108).

Schließlich wurde eine Methode nach Sleeth geprüft, die sich bereits in eigenen Versuchen zur Reinigung von *A. cladogamus* und *A. cochlioides* bewährt hatte (S. 95). Nur wurde hier an Stelle des vorgeschriebenen Agars[1]), auf dem *A. raphani* nicht wächst, filtrierter Hafermehlagar verwendet.

Der in einer Petrischale etwa 4 mm dick ausgegossene Agar wird in Viertel zerteilt, jedes Viertel in der Mitte beimpft und umgekehrt in eine neue Schale gelegt. Beim Durchwachsen der Pilzhyphen durch das Nährmedium sollen anhaftende Bakterien derart gehemmt werden, daß das Myzel nach wenigen Tagen an der Oberfläche rein abzuimpfen ist. Jedoch setzte bei den Impfstücken unter dem Agar eine derart starke Bakterienvermehrung ein, daß der Pilz, wenn er in Einzelfällen überhaupt an die Oberfläche gelangte, dort nicht ohne Verunreinigungen abzunehmen war.

Ein auf gleichem Prinzip beruhendes, technisch aber exakter durchgeführtes Verfahren (S. 95) brachte auch nicht die gesuchte Verbesserung der Ergebnisse.

Somit ist festzustellen, daß keine Methode gefunden wurde, die ein mehr als etwa 50 %iges Gelingen der Isolierungen des Erregers der Rettichschwärze verspricht. Die relativ besten Erfolge konnten bei Anwendung der Sublimatdesinfektionsmethode und filtriertem Hafermehlagar erzielt werden.

## 2. Reinigung von *Aphanomyces raphani* und anderen *Aphanomyces*-Arten

Aus Rettichstückchen auswachsendes Myzel ist stets mit Bakterien behaftet.

Auch in der Literatur der verschiedenen *A.*-Arten fallen vielfache Angaben über solche Verunreinigungen auf (Peters, Kasanowsky, Jones, Drechsler 1929, Buchholtz und Meredith).

[1]) 10 g Dextrose
2 g $NH_4H_2PO_4$
1 g $MgSO_4$
25 g Agar
1000 ccm Wasser

Agar und Dextrose in 800 ccm Wasser lösen und die in 200 ccm Wasser gelösten Salze hinzufügen.

Es liegt weiter die Annahme nahe, daß die mannigfachen Hinweise auf Schwierigkeiten bei der Kultur und Erhaltung dieser Pilze (Edson, Peters) teilweise mit derartiger Verseuchung in Zusammenhang stehen.

Der Reinigung von *A.*-Arten mußte daher besondere Beachtung geschenkt werden, vor allem, nachdem sich gezeigt hatte, daß 1. die Bakterienflora als feiner Belag jeden einzelnen Myzelfaden begleitet und 2. durch die Zähigkeit der Hyphen Abimpfungen kleinster Spitzen kaum durchführbar sind. Bei *A. raphani* tritt noch die geringe Wachstumsintensität hinzu (vgl. Abb. 12, 13, 14).

a) Verschiedene Nährböden

Es wurde versucht, durch selektive Nährböden entweder das Pilzwachstum entscheidend zu fördern oder die Entwicklung der Bakterien zu hemmen.

Diese Maßnahme hatte zwar bei den Isolierungen versagt, konnte hier aber mit Berechtigung trotzdem erneut geprüft werden, da das Rettichstück als besonders geeignete Regenerationsquelle für die sekundären Organismen ausgeschieden war. Diese wie alle folgenden Versuche wurden, wenn nicht besonders vermerkt, in Thermostaten bei 25 ° C durchgeführt.

Ansäuerung von Hafermehl- (S. 88) und Kartoffelagar (S. 98) mit 2,5-%iger Milchsäure und n/HCl auf pH 4,8 und pH 4,2 brachte, dem Bericht Kendricks entsprechend, keinen Erfolg.

Unter den oben angegebenen Gesichtspunkten wurden dann die folgenden Nährböden zusammengestellt.

Rettichsaftagar

100 ccm Wasser
3 g Agar
20 ccm Rettichsaft

(von geriebenem Rettich abgepreßt und nach Kaltsterilisation im Seitz-Filter dem noch gerade flüssigen Agar zugesetzt)

Rettichbreiagar

80 ccm Wasser
20 ccm geriebener Rettichbrei
2,5 g Agar

} an drei aufeinanderfolgenden Tagen je eine Stunde im Dampftopf sterilisiert

Glukoseagar I

100 ccm Wasser
3 g Agar
2 g Glukose
0,0001 g Leucin
0,0001 g Aneurin
0,01 g Asparagin

} im Autoklaven 1½ Stunde bei ½ Atü sterilisiert

Glukoseagar II

100 ccm Wasser
3 g Agar
2 g Glukose
0,001 g Leucin
0,001 g Aneurin
0,01 g Asparagin

} im Autoklaven 1½ Stunde bei ½ Atü sterilisiert

Auf allen vier Substraten blieben die Abimpfungen steril oder entwickelten nur Bakterien.

Ein weiterer Nährboden[1]) (Schick und Lehmann), der sich bei einem schwer in Kultur zu haltenden Stamm von *Phytophthora infestans* bewährt hatte, versagte ebenfalls, und auf Wasseragar (2 bis 3 % Agar) vegetierte der Pilz nur kümmerlich, jedoch die Bakterien ebenso.

b) Variation der Temperatur

Eine andere Möglichkeit der Trennung des Pilzes von den Bakterien wurde auf Grund einer Beobachtung in unterschiedlicher Wärmebehandlung vermutet; weitere Prüfungen ergaben aber, daß diese Reinigungsmethode unvollkommen war, und da bereits Kendrick unterschiedlicher Bebrütungstemperatur keinen Wert beilegte, wurde davon abgesehen, diese Versuche auf stärkere Extreme und abgestufte Behandlungszeiten auszudehnen.

c) Zusatz von Bakteriziden

Bei den Begleitorganismen handelte es sich in mehreren untersuchten Fällen um nicht näher bestimmte, grampositive Stäbchen und Kokken.

Theoretisch erscheint es daher nicht unmöglich, durch Antibiotica eine Reinigung zu erreichen. Versuche in dieser Richtung wurden außer mit dem Rettichparasiten noch mit drei weiteren *A.*-Arten *(A. cochlioides, A. cladogamus* und *A. euteiches)* durchgeführt, die vom Institut für Pilzkulturen in Baarn zu Vergleichszwecken erbeten worden waren und damals nur verunreinigt geliefert werden konnten.

Es hatte sich gezeigt, daß in bakterienverseuchten *Aphanomyces*-Kulturen auf Hafermehlagar bei zufällig eintretenden Verunreinigungen mit dunkelgrünen *Penicillium*-Arten an den Grenzzonen *A. raphani* leichtes Luftmyzel bildete. Doch war es nicht möglich, den Rettichparasiten aus derartigen Kulturen rein abzuimpfen. Daher ist mit Penicillin G, wie es in der Humanmedizin gebräuchlich ist, gearbeitet worden. In sterilisierte Hafermehlröhrchen wurden mit Injektionsspritzen Penicillin-Lösungen eingeführt, so daß die gebrauchsfertigen Nährböden dann je ccm 400, 800 oder 1600 i. E. Penicillin enthielten (therapeutischer Penicillinspiegel in der Humanmedizin nach einem Prospekt von Bayer etwa 43 i. E. je ccm Blut).

Keine der drei Konzentrationen beeinträchtigte das Wachstum von *A. raphani,* wenig aber auch nur die Entwicklung der Bakterien trotz mehrmaligen Überimpfens auf penicillinhaltigen Hafermehlagar.

Parallelversuche mit einem Stamm von *Staphylococcus aureus* (Testobjekt für Penicillin) erbrachten den Nachweis, daß der negative Erfolg nicht auf fehlerhafter Anwendungstechnik beruhte. Eine später aus Baarn eintreffende Mitteilung bestätigte die eigenen Ergebnisse; durch Penicillin-Behandlung wurde der Bakterienbefall verringert, aber nicht vollkommen ausgeschaltet.

[1]) 5 g Malzextrakt
0,6 g $KH_2PO_4$
0,3 g $MgSO_4$
20 g Agar
1000 ccm Wasser
} im Autoklaven 3/4 Stunde bei 3/4 Atü sterilisiert

Da Aureomycin neben gramnegativen auch andere grampositive Bakterien abtötet, wurde dieses Mittel in die Versuche einbezogen. Das Aureomycin war als stäbchenförmige Masse vom pharmakologischen Institut der Universität Bonn überlassen worden. Die Anwendungstechnik entsprach der oben dargestellten. Die Konzentrationen lagen bei 1,5 mg, 0,15 mg und 0,015 mg je ccm Nährsubstrat (in der Humanmedizin etwa 0,025 mg je g Körpergewicht). Die Pilze, aber auch die Bakterien ließen keine Wachstumsbeeinflussung erkennen.

Schultz erreichte die Reinigung von *Phycomyceten* durch Übertragen auf natriumrhodanidhaltige Nährböden (0,2 n).

Eigene Versuche mit kalium- und natriumrhodanidhaltigem Hafermehlagar ließen den Pilz nicht zur Entwicklung gelangen. Bei erniedrigter Konzentration (0,1 n) war die Ausbreitung des Myzels (auffallend verzweigte und bogenförmige Hyphen) stark und bei 0,05 n-haltigem Substrat etwas weniger verzögert.

Ein Zurückbleiben der Bakterien konnte in keinem Falle festgestellt werden. Dieser Mißerfolg ist vielleicht darauf zurückzuführen, daß die Hyphen Stoffe ausscheiden, die die Bakterien besonders fördern und so die Hemmung des bakteriziden Mittels nicht zur Auswirkung gelangen lassen, erst recht, da auch das Pilzwachstum verlangsamt ist. Manche Organismen bilden bekanntlich bei verzögerter Entwicklung Stoffwechselendprodukte (Inhalts- oder Ausscheidungsstoffe) in relativ stärkerem Maße.

Die Reinigungsversuche durch Zusätze zum Nährboden wurden darauf abgeschlossen.

d) Passage über den Wirt

Da Kendrick bei Isolierungen von *A. raphani* keine oder nur geringfügige Bakterienverseuchung erhielt, wenn er von kranken Stielen oder Blättern ausging, die von ihm beschriebenen Befallsformen in den eigenen Aussaaten aber nicht auftraten, wurde versucht, durch künstliche Blattinfektion den Pilz zu reinigen.

Auf größeren Rettichblättern durchgeführte Impfungen (S. 110) gingen nicht an.

An steril in Röhrchen gezogenen Sämlingen (S. 109) erkrankten Hypokotyl, Blätter und Stengel (S. 107). Teile solcher Befallsstellen wurden nach zweimaligem Schütteln in sterilem Wasser und Trocknen mit sterilem Filtrierpapier auf Agar ausgelegt. Aus den früh infizierten Abschnitten entwickelten sich nur Bakterien, während aus den mittleren Teilen von Hypokotylen und Stengeln wieder verunreinigtes Pilzmyzel auswuchs. Später in gleicher Weise mit gereinigten Kulturen durchgeführte Versuche ließen den Erreger bakterienfrei rückisolieren und führten zu der Annahme, daß das Mißlingen der Reinigung durch eine Wirtspassage auf physiologischen Eigenschaften des Pilzes, vielleicht einer besonderen Neigung, Bakterien an sich zu ziehen, beruht.

e) Unterschiedliche Technik

Drechsler (1929) erreichte die Trennung des *A.*-Myzels von den Bakterien durch Abimpfen der Spitzen nach der Methode von Brown.

In zahlreichen eigenen Versuchen gelang dieses Verfahren bei *A. raphani* nur in einem Fall. Bei *A. cladogamus* und *A. cochlioides* ergab es etwas günstigere Ergebnisse, die teilweise sicher dem stärkeren Wachstum dieser Arten zuzuschreiben sind.

Die Methode nach SLEETH (S. 91) führte bei den Baarner Arten zu gutem Erfolg. Jedoch bei dem Rettichparasiten ließ sich nur verseuchtes Myzel abimpfen.

Bei hartnäckiger Verbindung eines Pilzes mit Bakterien wird die Trennung gelegentlich erreicht, wenn man die Hyphen über reines trockenes Glas wachsen läßt. Dazu wurde in Petrischalen mit steifem Agar (3 % Agar, 1 % Hafermehl) je ein Graben (0,5 bis 1 cm breit) ausgehoben. Nach Beimpfen je einer Hälfte sollen beim Wachstum des Pilzes über das trockene Glas die Bakterien zurückbleiben und das Myzel auf dem zweiten Agarstück gereinigt abzunehmen sein (konstante Temperaturen, um Kondenswasser zu vermeiden!).

Bei *A. cladogamus* und *A. cochlioides* führte diese Methode zum Erfolg, da die Hyphen die Strecke von 1 cm ohne Nährsubstrat überwinden. Das Myzel von *A. raphani* dagegen war erschöpft, bevor es zur anderen Seite gelangte, und über kürzere Glaswege wurden auch die Bakterien mitgeschleppt.

Ein weiteres Arbeitsverfahren mit VAN TIEGHAM-Zellen (ARK) ließ endlich auch die Reinkultur von *A. raphani* mit größerer Sicherheit gelingen. Kleine Glasringe (22 × 9 mm) werden auf Füßchen von Modellierton in einer Petrischale in der Weise befestigt, daß unten ein 2 mm hoher Zwischenraum bleibt. Nach der Sterilisation werden die so vorbereiteten Schalen mit abgekühltem Agar etwa 6 mm dick ausgegossen.

In den eigenen Versuchen wurden an Stelle der Tonfüßchen Glasstücke gebraucht; dabei ist garantiert, daß keinerlei Stoffe in den Nährboden diffundieren. Die verunreinigte Kultur wird in die Mitte eines Glasringes geimpft, wodurch die Ausbreitung auf der Oberfläche sehr bald begrenzt ist. Bei weiterem Wachstum in den Agar und unter dem Ring hindurch bis zur äußeren Oberfläche des Nährbodens bekommt der Pilz einen solchen Vorsprung vor den Folgeorganismen, daß die ersten Hyphen hier bakterienfrei abgeimpft werden können. Dieses Reinigungsverfahren führt auch bei *A. raphani* mit größerer Sicherheit zum Ziele.

### 3. Verhalten von *Aphanomyces raphani* in Reinkultur und Vergleich mit anderen *Aphanomyces*-Arten

Die Beobachtungen bei den Reinigungsversuchen gaben Veranlassung, in die folgenden Untersuchungen andere *A.*-Arten mit einzubeziehen, um die Sonderstellung der behandelten Spezies eindeutig hervorzuheben.

a) Wuchsform und -geschwindigkeit auf festen Nährböden

Vor allem bei den Wachstumsversuchen auf verschiedenen Nährböden traten unterschiedliche Eigenschaften klar in Erscheinung.

Der Erreger der Rettichschwärze wächst in vitro gut auf Hafermehlnährböden, das Myzel breitet sich flach auf der Oberfläche und auch tiefer in das Substrat hinein aus.

Bei sehr steifem Agar sind gelegentlich vereinzelt zarte Lufthyphen zu beobachten. Geringe Bakterienverunreinigung ist auf diesem Nährboden mit dem bloßen Auge nicht wahrzunehmen. Abimpfungen gelingen noch von 40 Tage alten bei Zimmertemperatur aufbewahrten Röhrchen.

Bei *A. cladogamus, A. cochlioides* und *A. euteiches* ist die Art des Myzelwachstums die gleiche wie bei *A. raphani*, die Ausbreitungsgeschwindigkeit aber erhöht.

Ein besonders günstiges Medium für den Rettichparasiten ist X-Agar (in Baarn zur Kultur von *Phycomyceten* verwandt), der sich zusammensetzt aus gleichen Teilen:

Kirschagar

75 ccm Kirschsaft mit n/KOH auf pH 5,8 neutralisiert
925 ccm Wasser
20 g Agar
Kirschsaft im Kölbchen gesondert sterilisieren und dann dem Agar zugeben

Hafermehlagar

10 g Hafermehl
20 g Agar
1000 ccm Wasser
} filtrieren

Pepton-Glukose-Saccharose-Agar

1 g $K_2HPO_4$ | 10 g Pepton | 15 g Agar
1 g $KNO_3$ | 30 g Glukose | 1000 ccm Wasser
0,5 g $MgSO_4$ | 20 g Saccharose

Diese drei Nährböden gesondert zubereiten und nach dem Zusammenschütten 3/4 Stunde bei 3/4 Atü sterilisieren.

Der Pilz entwickelt etwa 6 mm hohes, watteartiges Luftmyzel, wie es bisher in der Literatur für *Aphanomyces* nicht beschrieben wurde.

Ein Nachteil dieser kräftigen Wuchsform, die sich innerhalb ein bis zwei Tagen aus einer vorgeschobenen Substratmyzelzone (0,5 bis 1 cm) bildet, ist die kurze Lebensdauer dieser Hyphen. Das Luftmyzel ist drei bis vier Tage nach seiner Entstehung von der Mitte aus mit Wassertröpfchen durchsetzt, etwa wie Spinnweben im Nebel. Dann fällt es bald ganz in sich zusammen und liegt als dichte, sehr zähe, leicht abhebbare Decke auf dem Agar. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist größer als auf Hafermehlagar (Abb. 12).

„Tröpfchenmyzel" und erst recht eingefallenes Myzel sind für Überimpfungen nicht mehr verwendbar. Ebenso sind einzelne, tiefer in das Medium hineingewachsene Pilzhyphen für die Anlage neuer Kulturen unbrauchbar.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten, daß junge Hyphen prall und mit gleichmäßig körnigem Plasma gefüllt sind, während alte sich durch unregelmäßige Konturen und grobkörnigen, teils stark zusammengezogenen Inhalt kennzeichnen.

Da jedoch „Tröpfchenmyzel" und auch frisch eingefallenes sich auf diese Weise nicht von entwicklungskräftigem unterscheiden, wurde versucht, mit Färbemitteln eine Differenzierung zu ermöglichen.

Verdünntes Methylenblau und Neutralrot bewirken bei Bäckerhefe durch verschiedene Farbaufnahme toter und lebender Zellen eine scharfe Unterscheidung. Diese tritt aber bei den Hyphen von *A. raphani* bei beiden Mitteln nicht ein.

Weitere Versuche mit 0,1-prozentiger Triphenoltetrazoliumchloridlösung (zur Unterscheidung lebender und toter Gewebe höherer Pflanzen) riefen weder bei Hefezellen noch bei Pilzmyzel irgendwelche Farbeffekte hervor.

So bleibt also zur Kontrolle auf die Lebensfähigkeit der Hyphen vorerst nur das Überimpfungsexperiment.

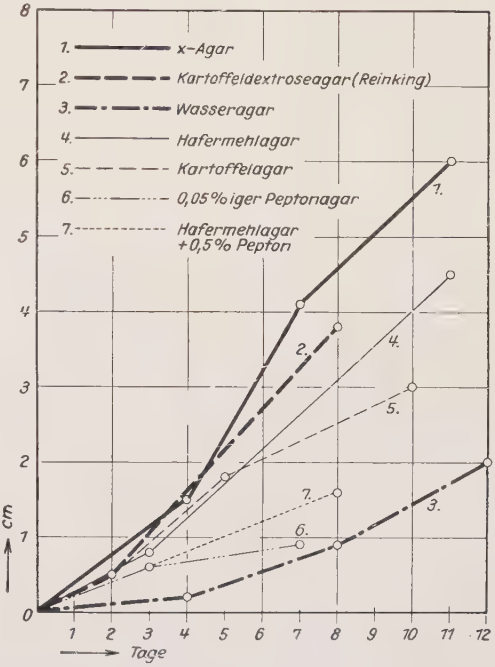



Abb. 12. Wachstum von *A. raphani* auf verschiedenen Nährböden

*A. cladogamus* und *A. cochlioides* bilden auf X-Agar auch Luftmyzel, das aber nur 1 bis 2 mm hoch ist, vielleicht einem niedrigen Rasen vergleichbar. Dieses Luftmyzel fällt erst nach 10 bis 15 Tagen ein, und Abimpfungen lassen sich auch mit eingesunkenem Myzel noch durchführen. Auf dem Agar entsteht wieder, wie oben beschrieben, eine feste Decke. Die Ausbreitungsgeschwindigkeit ist um weniges geringer als bei Hafermehlagar (Abb. 13, 14). *A. euteiches* bildet auf X-Agar kein Luftmyzel, die Hyphen sind auf der Oberfläche zu einer abhebbaren, aber nicht zähen Schicht vereinigt.

Um festzustellen, welche Komponente des X-Agars die kräftige Entwicklung bewirkt, wurde zu Hafermehlnährböden 0,2 % Pepton gegeben (X-Agar enthält 0,33 %). Bei *A. raphani* war schwach sichtbares, zartes Luftmyzel, aber keine feste Decke auf dem Agar zu beobachten. *A. cochlioides* und *A. cladogamus* ließen einzelne Lufthyphen erkennen, während das Substratmyzel von *A. euteiches* sich wie üblich verhielt. Auffallend ist die gegenüber normalen Hafermehlnährböden gehemmte Zuwachsintensität bei den drei erstgenannten Arten (Abb. 12, 13, 14).

Ein Zusatz von 3 % Kirschsaft (auf pH 5,8 neutralisiert, X-Agar enthält 2,5 %) zu Hafermehlagar brachte bei keiner der vier Spezies eine Veränderung der bekannten flachen Wuchsform.

Auf kirschsaftfreiem X-Agar (Wasser-, Hafermehl-, Pepton-Glukose-Saccharoseagar) war bei allen vier Arten kein Unterschied gegenüber vollständigem X-Agar zu beobachten.

Auf einfachem Kirschagar dagegen (3 % Kirschsaft, 2 % Agar nach dem Aufkochen auf pH 5,8 neutralisiert) kam *A. raphani* gar nicht zur Entwicklung, während *A. cochlioides* sich als Substratmyzel ausbreitete.

Damit ist erwiesen, daß der Kirschsaft keine luftmyzelbildenden Stoffe enthält, die nicht auch in den übrigen Nährmedien vorhanden sind, vielmehr hat es, da *A. raphani* auf

Wasseragar wächst, auf Kirschagar dagegen nicht, den Anschein, als seien in diesem Hemmstoffe vorhanden, die in dem vielseitig zusammengesetzten Medium abgepuffert werden.

Auch auf Pepton-Glukose-Saccharoseagar läßt sich *A. raphani* nicht kultivieren.

Auf X-Agar mit 3-, 6- und 12facher Konzentration der Mineralsalze ($MgSO_4$, $KNO_3$, $K_2HPO_4$) entsteht bei diesen drei Spezies normales Luftmyzel.

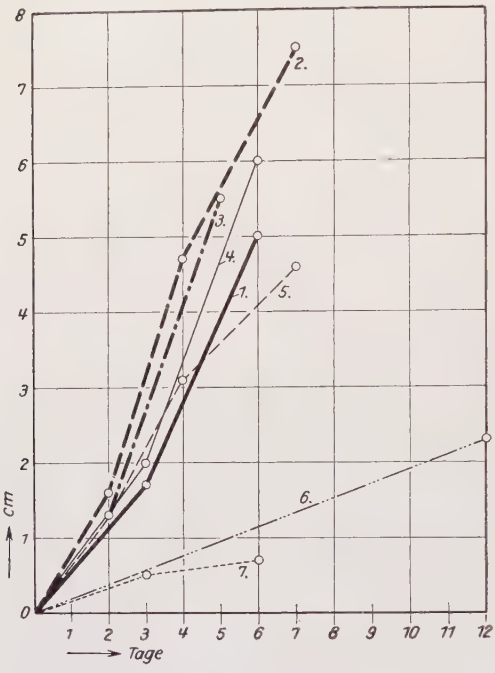



Abb. 13. Wachstum von *A. cochlioides* auf verschiedenen Nährböden (Zeichenerklärung auf Abb. 12)

Impfstücke mit geringer Bakterienverunreinigung gehen auf X-Agar bei *A. raphani* nicht an, während bei *A. cochlioides* und *A. cladogamus* nur die Luftmyzelbildung unterbleibt.

Mehrmals sterilisierter X-Agar nimmt eine dunklere Farbe an. *A. raphani* läßt sich auf ihm nicht zur Entwicklung bringen; die drei anderen Arten zeigen sich gegenüber dieser Behandlung unempfindlich.

Auf Kartoffeldextrose- und Kartoffelagar nach Reinking[1]) wächst *A. raphani* in der von Kendrick beschriebenen Weise: er breitet sich flach über das Medium aus und entwickelt in jungen Kulturen wenig leichtes Luftmyzel, das bald wieder einfällt und eine nicht ganz so zähe Matte wie auf X-Agar hinterläßt. Abimpfungen sind nur bis zum Luftmyzelstadium möglich, später vorgenommene gehen nicht an.

*A. cladogamus*, *A. cochlioides* und *A. euteiches* zeigen die bei X-Agar beschriebenen Merkmale (S. 97).

Ein Zusatz der Salze des X-Agars in dreifacher Konzentration brachte kein kräftigeres Luftmyzel.

Nach diesen Versuchen scheint die üppige Entwicklung von *A. raphani* nicht durch einen bestimmten Stoff hervorgerufen zu werden, sondern auf dem Zusammenwirken der Substanzen des Hafermehls oder Kartoffelextraktes mit denen des Pepton-Glukose-Saccharoseagars zu beruhen.

Auf Kartoffel- und Kartoffeldextroseagar nach Appel

| | |
|---|---|
| 40 ccm Kartoffelsaft | 2 g Agar |
| 60 ccm Wasser | evtl. 1,5 g Dextrose |

konnte *A. raphani* nicht zur Entwicklung gebracht werden. *A. cochlioides* und *A. cladogamus* aber bildeten auf diesem Kartoffeldextroseagar dichtes, nicht

[1]) Filtrat von 200 g geschälten gekochten Kartoffeln
15 g Dextrose
25 g Agar
1000 ccm Wasser
Bei Kartoffelagar Dextrose fortlassen.

zähes Substratmyzel und letztere Art auch einzeln Lufthyphen. Auf Kartoffelagar ist die Wuchsform ähnlich, jedoch weniger dicht, und der tägliche Zuwachs bei beiden Arten ist größer.

Auf Agar nach HÖHNK (S. 89) entwickelt *A. raphani* sich nur sehr schwach; nie wächst er weiter als 1,5 bis 2 cm über das Impfstück hinaus. *A. cochlioides*, *A. cladogamus* und *A. euteiches* dagegen zeigen schnelle Ausbreitung vereinzelt liegender Hyphen.

Auf dem von SLEETH angegebenen Agar (S. 91) läßt sich *A. raphani* nicht kultivieren. *A. cochlioides* wächst kräftig mit knäuelartigen Myzelverzweigungen im Substrat, und *A. cladogamus* bildet neben diesen auch das bekannte Luftmyzel. *A. euteiches* reagiert auffallend mit besonders dichtem, weiß aussehendem Hyphengeflecht, das sich nur sehr langsam ausbreitet.

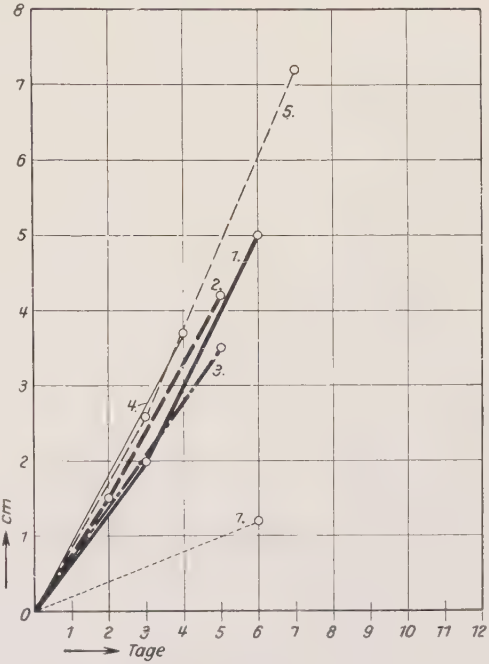



Abb. 14. Wachstum von *A. cladogamus* auf verschiedenen Nährböden (Zeichenerklärung auf Abb. 12)

Auf Bierwürzeagar (40 ccm Bierwürze, 60 ccm Wasser, 2 g Agar) wächst *A. raphani* nicht, während die drei anderen Arten sich dort flach ausbreiten.

Bei der graphischen Darstellung der Wachstumsgeschwindigkeit der einzelnen Arten auf verschiedenen Nährböden sind vor allem die stets schräger verlaufenden Linien bei *A. raphani* zu beachten.

b) Wuchsform und -geschwindigkeit in flüssigen Medien

Unter mannigfachen Literaturhinweisen auf Kultivierung von *Aphanomyces* in Flüssigkeiten wird u. a. von KASANOWSKY, PETERS, DRECHSLER und von KENDRICK speziell für *A. raphani* Erbswasser empfohlen.

Dazu wurden in 100 ccm-Kölbchen je 50 ccm Wasser mit fünf getrockneten Erbsen 3/4 Stunde bei 3/4 Atü sterilisiert.

Der Pilz wuchs vom Grunde der Flüssigkeit zur Oberfläche herauf und überzog diese mit einer dichten Myzeldecke, die dann wenige Tage später einige Millimeter unter den Flüssigkeitsspiegel sank. Sobald frisches Erbswasser zugefüllt wurde, setzte eine neue Wachstumsperiode ein, bis sich an der Oberfläche erneut eine dichte Schicht bildete. Bei Ergänzung der Nährlösung erst zehn Tage nach dem Erreichen der Oberfläche unterblieb die Weiterentwicklung: der Pilz scheint durch Alterung abgestorben zu sein.

Abb. 15
Zonenbildung im Myzel bei *A. raphani*

Kulturversuche von *A. raphani, A. cochlioides* und *A. cladogamus* in 1 %iger Peptonlösung in Reagenzröhrchen zeigten kräftiges Hyphenwachstum. Auffallend war dabei, daß im Myzel Zonen verschiedener Dichte auftraten (Abb. 15). Diese waren bei den einzelnen Röhrchen annähernd gleich, ließen aber eine Übereinstimmung mit den Tagesrhythmen nicht sicher feststellen. Spezielle Versuche ergaben weiter, daß keine Abhängigkeit von Licht- und Temperaturschwankungen bestand.

In 0,5 %iger Peptonlösung wurde nur ein geringer Unterschied zwischen den verschieden dichten Abschnitten im Myzel festgestellt, der schließlich bei noch stärkeren Verdünnungen ganz fortfiel.

Bei *A. euteiches* trat überhaupt keine Zonenbildung ein.

Auf Abkochungen von Rettichknollenstücken (200 und 100 mg je 10 ccm Wasser) entwickelte *A. raphani* sich kräftig und bildete Zonen, während bei Auszügen von Blättern (200 und 50 mg) und vom Hypokotyl junger Pflänzchen (200, 100 und 50 mg) nur schwaches, kaum oder gar nicht gezontes Myzelwachstum stattfand (siehe auch Tab. 1).

c) Bildung der Fortpflanzungsorgane

Die Bildung der Sexualorgane von *A. raphani* ist auf den einzelnen Nährböden sehr unterschiedlich. Kendrick beobachtete sie in starkem Maße auf „corn-meal"- und Drechsler auf „maize-meal"-Agar. Ebenso findet sie auch auf Hafermehlagar statt.

Auffallend und sehr bemerkenswert war hier, daß sich die Bildung stärker und schneller in bakterienhaltigen Kulturen als in reinen vollzieht.

Die gleiche Beobachtung wurde schon von Drechsler (1929) bei *A. cochlioides* gemacht. Er hält es für möglich, daß die Entwicklung des Sexualapparates in Beziehung zu Zerfallsprozessen durch sekundäre Organismen steht. Die eigenen Untersuchungen an *A. raphani* lassen Zweifel an der Richtigkeit dieser Deutung.

Auf X-Agar sind Oosporen nur in vereinzelten Kulturen, dann aber reichlich zu finden. Öfter waren runde, dünnwandige, teilweise mit einer grobkörnigen Masse gefüllte oder auch ganz leere Gebilde in der Größenordnung von Oogonien zu beobachten. Vermutlich handelte es sich um unbefruchtete, in diesem Stadium abgestorbene Oogonien.

Ursachen für die gelegentlich starke Oosporenbildung ließen sich nicht finden.

Die Größe der aus zahlreichen Isolierungen stammenden Oogonien liegt mit einem Durchmesser von 25 $\mu$ bis 34 $\mu$ erheblich niedriger als die Werte aus dem amerikanischen Verbreitungsgebiet (Kendrick 32 $\mu$ bis 44,9 $\mu$ und Drechsler 26,5 $\mu$ bis 51,5 $\mu$), so daß bei den weit voneinander entfernten

Herkünften unterschiedliche Rassen (von SMITH für *A. laevis* festgestellt) vorliegen könnten.

Dieser Möglichkeit widerspricht zwar der Hinweis von BÖNING (1932), daß seine Befunde „in allen Punkten mit KENDRICKS Angaben übereinstimmten", und für die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche muß die Annahme biologischer Rassen abgelehnt werden, da alle Abimpfungen von derselben Isolierung stammten und durch starke geschlechtliche Vermehrung ständig miteinander in Verbindung standen.

Auf Nährböden, auf denen nur zartes Luftmyzel entsteht (Kartoffel-, Kartoffeldextrose- und Kartoffeldextroseagar plus Salze), waren manchmal normale, ebensooft aber auch die unentwickelten Organe oder überhaupt keine Andeutungen derselben zu finden.

Auf Wasseragar konnten nur in der Nähe der Impfstücke (etwa 1 cm) einzelne Fruktifikationsorgane festgestellt werden, und auf rhodanidhaltigem Hafermehlagar (S. 94) traten niemals Oogonien oder Antheridien auf. Bei Überimpfungen von X-Agar auf wasser- oder rhodanidhaltigen Agar setzte in der kleinen, von der Ausgangskultur stammenden Nährbodenmenge starke Oosporenbildung ein, während in den Ausgangsröhrchen keine Oosporen zu finden waren. Eine Erklärung für diese Vorgänge könnte sich nach KLEBS aus dem Nährstoffvorrat ergeben: in seinen Versuchen (mit *Saprolegnia mixta*) entstanden bei einer gewissen Erschöpfung des Substrats Zoosporen und bei weiterer Verarmung des Mediums Oosporen. Entsprechend den KLEBS'schen Untersuchungen wurden diese Verhältnisse in Leucin- und Peptonlösungen an *A. ratphani* und *A. cochlioides* weiter verfolgt.

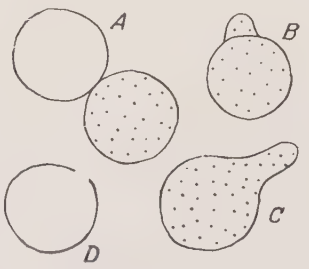



Abb. 16
A: Soeben aus der ersten Hülle geschlüpfte Zoospore, die nun in das begeißelte Stadium eintritt.
B, C: Keimende Zoosporen.
D: Leere Hülle aus der ein begeißelter Schwärmer schlüpfte (140fach)

Bei *A. raphani* fand in 0,5 und 0,05 %igem Leucinwasser kein Hyphenwachstum statt, aber nach vier Tagen war in den Sporangien die Entstehung von Zoosporen sowie die Ansammlung solcher vor den leeren Sporangien in der von KENDRICK beschriebenen Weise zu beobachten. Nach weiteren drei Tagen zeigte das Impfmaterial mikroskopisch in der 0,05 %igen wenige und in 0,005 %iger Leucinlösung zahlreiche Zoosporen, von denen sich viele gerade im Stadium des Ausschlüpfens befanden; die leeren Hüllen blieben noch einige Tage erhalten, während sich die begeißelten Schwärmer lebhaft durch das Wasser fortbewegten (Abb. 16).

In derartigen Flüssigkeitskulturen ließ sich einwandfrei beobachten, daß der Pilz monözisch ist. Dies wurde zwar schon von KENDRICK mitgeteilt, aber von DRECHSLER (1929) wieder angezweifelt.

Bei *A. cochlioides* war in Leucinwasser keine Bildung von Fruktifikationsorganen festzustellen.

In Peptonlösungen von 1- und 0,5 %igem Gehalt traten bei beiden Pilzen innerhalb zweieinhalb Monaten weder Zoosporen noch Oosporen auf.

In 0,05 %iger Lösung waren bei *A. raphani* vom siebenten Tage an sehr viel schwärmende und am dreizehnten Tage teilweise gekeimte Zoosporen und Oosporen zu finden. *A. cochlioides* ließ in der gleichen Lösung nach vier Tagen Oogonien und Antheridien erkennen; am dreizehnten Tage konnten zahlreiche Oosporen festgestellt werden.

In 0,01 %igem Peptonwasser zeigte *A. raphani* schon nach vier Tagen einzelne Zoosporen, am siebenten Tage waren zahlreiche Zoosporen sichtbar, kugelig zusammengeballt oder einzeln umherschwärmend, und bis zum dreizehnten Tage hatte eine starke Oosporenbildung eingesetzt. Bei *A. cochlioides* waren in sieben Tagen Zoosporen, Oogonien und Antheridien und nach dreizehn Tagen in großer Zahl Oosporen vorhanden.

In 0,0005 %iger Peptonlösung war bei *A. raphani* nach vier und nach sieben Tagen geringe Zoosporenbildung festzustellen, während Oosporen bis zum dreizehnten Tage nicht gefunden wurden. *A. cochlioides* wies nach sieben Tagen Oogonien und Antheridien auf, die sich bis zum dreizehnten Tage teilweise zu Oosporen weiterentwickelt hatten (Tab. 1).

Die Bedingungen für die Bildung der Fortpflanzungsorgane wurden weiter verfolgt in Lösungen mit vielseitig zusammengesetzten, natürlichen Nährsubstraten.

Kendrick stellte in Abkochungen junger Rettichwurzeln in drei bis zwölf Stunden starke Zoosporenbildung, in ein bis zwei Tagen bescheidenes Myzelwachstum, nach drei Tagen Oogonien und Antheridien und nach acht Tagen Oosporen fest. In den eigenen Versuchen mit Hypokotylteilen junger Sämlinge konnten bei 200 und 100 mg je 10 ccm Wasser diese Feststellungen bestätigt werden; bei 50 mg je 10 ccm Wasser war die Myzelbildung bedeutend geschwächt (Fruktifikation in der beschriebenen Weise).

Bei Blattabkochungen von 200 mg je 10 ccm Wasser folgte auf geringe Myzelbildung sofort Oosporenbildung, während bei niedrigerer Konzentration (50 mg je 10 ccm Wasser) das vegetative Wachstum noch stärker reduziert war und nach kräftiger Zoosporen- eine ebenso starke Oosporenbildung einsetzte.

In Nährlösungen mit Stückchen dicker Rettichknollen (200 und 100 mg je 10 ccm Wasser) zeigte sich bis zum 14. Tag nur schwach gezontes vegetatives Myzel. Am 27. Tag waren neben einzelnen Zoosporen reichlich Oogonien mit Antheridien und Oosporen zu finden.

Die Zusammenfassung der Ergebnisse (Tab. 1) läßt die Tendenz in der von Klebs angegebenen Richtung besonders bei *A. raphani* deutlich erkennen, vor allem, wenn man berücksichtigt, daß die Knollen als Speicherorgane der Pflanzen höhere Nährstoffvorräte aufweisen als die Hypokotyle der Sämlinge und die Blätter. Von den beiden letzteren scheint das Hypokotyl mehr myzelwachstumsfördernde Stoffe zu enthalten.

*Tabelle 1*

Bildung von Fortpflanzungsorganen und vegetativem Myzel in verschiedenen Flüssigkeiten

| | | *A. raphani* | | *A. cochlioides* | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | veget. Myz. | Sexualorgane | veget. Myz. | Sexualorgane |
| 1 % | Pepton | ××××××× | O | ×××××××××× | O |
| 0,5 % | „ | ××××/ | O | ×××× | O |
| 0,005 % | „ | ×××/ | z Oo Oo | ×××/ | Oo |
| 0,001 % | „ | ×/ | z z Oo Oo | ×××/ | z Oo |
| 0,0005 % | „ | | z | ××× | Oo |
| | | // | | | |
| 0,05 % | Leucin | / | z | ××× | O |
| 0,005 % | „ | / | z z | ×/ | O |

| | | *A. raphani* | |
|---|---|---|---|
| | | veget. Myz. | Sexualorgane |
| Blattabkochung | 200 mg je 10 ccm | ×××/ | Oo Oo |
| „ „ | 50 mg je 10 ccm | ×/ | z z Oo Oo |
| Hypotokylabk. | 200 mg u. 100 mg | ×××× | z z Oo |
| „ „ | 50 mg | ×/ | z z Oo Oo |
| Knollenabkochung | 200 mg u. 100 mg | ××××/ | z Oo Oo |

Zeichenerklärung:

| | | | |
|---|---|---|---|
| ×××××× | reichlich vegetatives Myzel | z | kaum Zoosporen |
| / / / | kaum vegetatives Myzel | Oo Oo Oo Oo Oo | reichlich Oosporen |
| z z z z z z | reichlich Zoosporen | Oo | kaum Oosporen |

Weiter wurden diese Verhältnisse auf festen Nährböden geprüft. Bei *A. raphani* waren in 1 %igem und 0,5 %igem Peptonagar keine Oosporen festzustellen.

In 0,05 %igem und 0,005 %igem Peptonagar waren teilweise leere oder mit undifferenzierter Masse gefüllte Organe vorhanden. Bei 0,001 %igem Peptonagar entstanden in einzelnen Versuchen normale Oosporen, während in 0,0005 %igem Peptonagar die beschriebenen unvollständig entwickelten Gebilde auftraten und auf Wasseragar nur nahe dem Impfstück Oosporen gefunden wurden.

Bei *A. cochlioides* war auf 1-, 0,5-, 0,05- und 0,005 %igem Peptonagar keine Bildung von Fortpflanzungsorganen festzustellen, während bei 0,001- und 0,0005 %igem Peptonagar Oosporen in geringer Zahl vorhanden waren.

Auf Hafermehlagar mit Peptonzusatz (0,5 %) kam es bei keiner der *Aphanomyces*-Arten zur Bildung von Fortpflanzungsorganen.

Diese Resultate stimmen überein mit der Feststellung von Geach (ref. Garret), daß bei *A. euteiches* nach Zusatz von 2 % Pepton zu „corn-meal"-Agar die Bildung von Oogonien und Oosporen unterbleibt.

Die Gesamtheit dieser Versuche scheint somit einen Beitrag zu den Klebs'schen Untersuchungen zu liefern; bei reichlicher Eiweißernährung unterbleibt die Zoosporenbildung, während sie bei mittlerer Versorgung in schwachem Maße stattfindet, um bei ganz geringem Gehalt wieder unterbunden zu werden.

Zur Frage der sexuellen Fruktifikation wurde weiter festgestellt, daß in jungen sporenfreien *Aphanomyces*-Kulturen um Impfstellen einer roten Hefe *(Rhodutorula glutinis)* nach wenigen Tagen in 1 bis 2 cm Breite eine heftige Oosporenbildung einsetzte.

Die Wirkung der Hefe könnte auf der Lieferung entwicklungsbeeinflussender Ausscheidungen oder auf Nährstoffkonkurrenz beruhen. Es wurden zur Untersuchung dieser Frage an den Rand junger *Aphanomyces*-Kulturen *Rhodutorula glutinis* und verschiedenartige Bakterien geimpft.

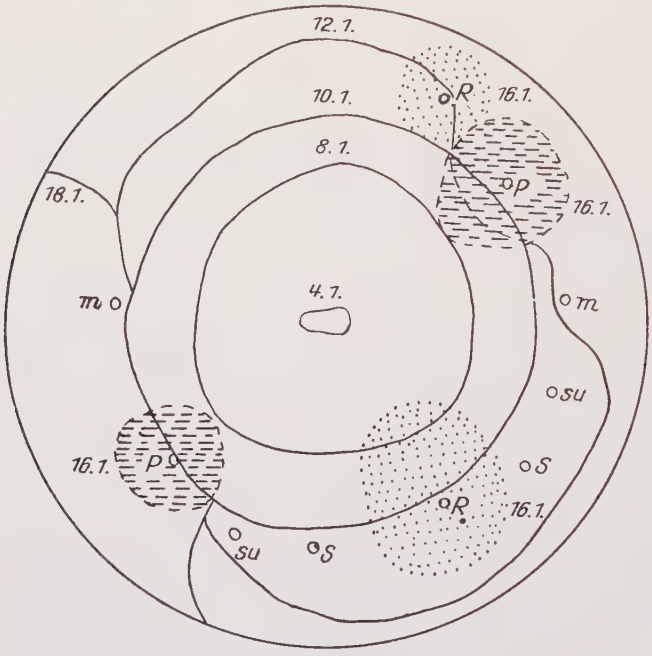



Abb. 17. Auswirkungen von Bakterienimpfungen in einer Kultur von *A. raphani* (nach Tuschemarkierungen auf der Unterseite einer Petrischale gezeichnet)
Schale beimpft am 4. Januar 1951 mit *A. raphani*, am 10. Januar 1951 mit

Rg = *Rhodutorula glutinis*
S = *Sarcina lutea*
su = *Bacterium subtilis*
m = *Bacterium mesentericus*
p = *Pseudomonas pyocyanea*
Oosporen
durch Bakterien (p) fluoreszierende Zone, in der die Hyphen nicht mehr erkennbar sind

Dabei zeigte sich, daß *Sarcina lutea* und *Bacterium subtilis* keinen Einfluß auf das Pilzwachstum ausüben, während *Bacterium mesentericus* und *Pseudomonas pyocyanea* das Myzelwachstum zum Stillstand bringen (Abb. 17). Darüber hinaus sind in den Ausbreitungszonen des letzteren (starker Eiweißzehrer: Rippel - Baldes) die bereits vorhandenen Pilzhyphen nach einigen Tagen nicht mehr erkennbar (fluoreszierende Zone); wahrscheinlich hat das Bakterium das Myzel zersetzt, um es zum eigenen Aufbau zu verwenden.

Ein Einfluß auf die Fruktifikation von *A. raphani* wurde bei keinem dieser vier Bakterien wahrgenommen. Es ist deshalb anzunehmen, daß die Förderung durch den Hefepilz nicht auf Nährstoffentzug, sondern auf besonderen Ausscheidungen beruht.

### d) Keimung der Oosporen

Die Keimung der Oosporen von *A. raphani* ist von Kendrick nicht beobachtet worden und auch nach den späteren Arbeiten von Drechsler

und Böning nicht bekannt. Ebenso wurden für *A. cochlioides* und *A. cladogamus* keine diesbezüglichen Angaben gefunden.

Oosporen von *A. laevis* keimen nach einer mehr als siebenmonatigen Ruhezeit (Aufbewahrung in Wasser) durch direkte Myzelbildung (Kasanowsky); später konnte auch eine indirekte Keimung durch Zoosporen festgestellt werden (Ziegler).

Bei *A. euteiches* setzt die Keimung dieser Vermehrungsorgane gleich nach ihrer Entstehung ein (Jones).

In den eigenen Versuchen mit *A. raphani* waren erstmalig mit einem Keimschlauch austreibende Oosporen zu beobachten, und zwar in verfaulten, zweieinhalb Monate naß im Reagenzglas aufbewahrten Rettichresten.

Der gleiche Keimungsmodus war später auch in eineinhalb und zweieinhalb Monate alten Kulturen (Hafermehl) festzustellen (Abb. 18).

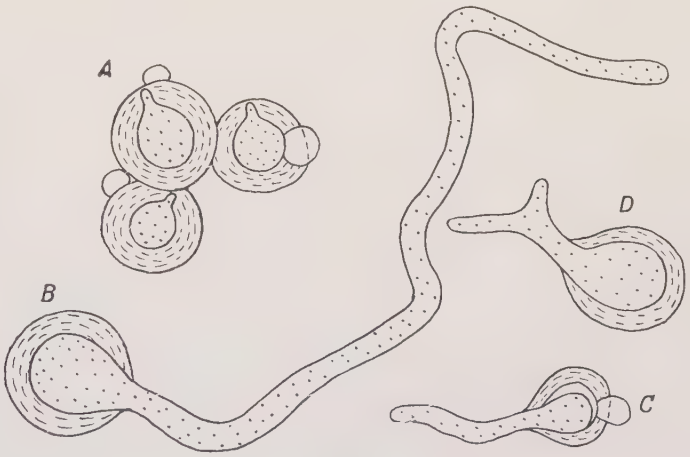



Abb. 18. Keimende Oosporen, seitlich noch die leeren Antheridien vorhanden. — A Der Keimschlauch beginnt die Oosporen- und Oogonienwand zu durchbrechen; B, C, D weiter fortgeschrittene Keimungsstadien, bei C noch ein Teil der bei den übrigen Präparaten nicht mehr erkennbaren Oosporenwand sichtbar

Nach Ziegler soll zum Keimen der Oosporen von *A. laevis* Licht notwendig sein. Bei einem Bodenparasiten ist das wenig verständlich. So fand ich für die Oosporen von *A. raphani* in der Tat auch keinen Unterschied, ob sie unter normaler Belichtung oder bei vollständiger Dunkelheit keimten. Noch in sieben Monate alten Hafermehlkulturen waren neben leeren Hüllen eben keimende, in der Mehrzahl aber unveränderte Oosporen zu finden, ein Hinweis, daß ihr Reifegrad unterschiedlich ist.

e) Beobachtungen bei Myzelübertragungen

Während der experimentellen Arbeiten zeigte es sich, daß an manchen Tagen Abimpfungen des Pilzes, besonders bei bakterienverunreinigten Kolonien, gar nicht oder nur zu ganz geringem Prozentsatz anwuchsen, während sie an anderen Tagen bei Verwendung der gleichen Ausgangskultur und desselben Nährsubstrates unschwer gelangen. Deshalb sind Zusammenhänge mit der Wetterlage, wie sie für die Lebenstätigkeit anderer Organismen bereits nachgewiesen sind (Rippel, Bortels 1942). vermutet worden. Auch die Zonenbildung bei *A. raphani* in flüssigen Nährböden (S. 100) könnte ein Hinweis auf seine Sensibilität gegenüber dem meteorologischen Geschehen sein.

Ein Vergleich der erfolgreichen Übertragungen mit den Luftdruckschwankungen an elf Tagen zwischen dem 31. Mai und 9. Juli 1950, an denen im Durchschnitt je 28 (13 bis 46) Impfungen vorgenommen wurden, konnte keine gegenseitigen Beziehungen aufzeigen. Allerdings wurde nicht berücksichtigt, zu welcher Tageszeit die Abimpfungen durchgeführt waren, sondern nur die am jeweiligen Tage vorherrschende Tendenz zum Vergleich herangezogen. Bei den starken täglichen Luftdruckschwankungen während dieser Monate wäre es möglich, daß auf diese Weise die Reaktionen eines besonders sensiblen Organismus überdeckt werden. Abschließend kann deshalb die hier angeschnittene Frage noch nicht beantwortet werden.

Bei den drei anderen *A.*-Arten traten keine Schwierigkeiten beim Überimpfen auf, was wiederum die Annahme einer ausgeprägten Empfindlichkeit von *A. raphani* nahelegt.

### 4. Verhalten des Pilzes im natürlichen Wirt

a) Infektion und Überwinterung

Das hartnäckige Zusammenleben des Pilzes mit Bakterien (S. 86 bis 95) könnte den Gedanken nahelegen, daß *A. raphani* erst in Gemeinschaft mit diesen die Rettichschwärze hervorruft. Jedoch sprechen die Isolierungsversuche mit Rettichstücken aus stark abgesetzten Befallsstellen (S. 86), die nach Auslegen in Wasser oder auf verschiedenartigen Agar keine Bakterienentwicklung zeigten, gegen diese Hypothese.

Zur Sicherung der Ergebnisse wurden aber darüber hinaus keimfrei herangezogene Rettichpflanzen (S. 109) mit

a) reinem Myzel,

b) nach der Isolierung noch nicht gereinigtem Myzel und

c) Reinkulturen der aus Rettichen isolierten Bakterien geimpft.

Bei a) und b) traten die an Sämlingen bekannten Symptome (S. 84) auf, während bei c) nach einiger Zeit die Wurzelspitzen und dann weiter die ganzen Pflanzen einer übelriechenden Fäule zum Opfer fielen. Unbeimpfte Kontrollen blieben gesund. Bei Rettichscheiben, die einerseits mit Pilzmyzel und andererseits mit Bakterienkulturen infiziert wurden (S. 110), war der Pilz nach wenigen Tagen durch einen ganz zarten Luftmyzelüberzug und darauffolgende bräunliche Verfärbung erkennbar, während bei den Bakterien das Pflanzengewebe bald in eine gelbliche weiche Masse überging und an den Grenzzonen beider Impfungen der Pilz schnell überwuchert wurde.

Somit ist die Feststellung früherer Autoren eindeutig bestätigt: die Rettichschwärze wird allein durch den Pilz *A. raphani* verursacht.

Als Überwinterungsorgan gibt Kendrick die Oosporen an, obwohl er sie nur selten fand und ihre Keimung nie beobachtete. Böning erwägt auch die Möglichkeit, daß der Erreger als Myzel im Boden fortexistiert. Nachdem nunmehr aber die Empfindlichkeit der Hyphen gegen Trockenheit und ihre kurze Lebensdauer im Wirt und auf vielen Nährböden nachgewiesen, anderer-

seits die Oosporenbildung und -keimung einwandfrei beobachtet werden konnten, scheint mir kein Grund vorzuliegen, an der Annahme, daß der Parasit in Myzelform überwintert, noch weiter festzuhalten. Dagegen spricht auch, daß sechs Monate lufttrocken aufbewahrte Stuttgarter Erde nach Vermischung mit 96 % Sand ausgezeichnete Infektionsergebnisse brachte.

b) Vegetatives Wachstum

Im Rettichgewebe wächst der Pilz in den Interzellularen, dadurch sind diese später mit einer dunkelbraunen körnigen Masse gefüllt (KENDRICK). Die anstoßenden Zellwände werden braun bis schwarz (Abb. 19). Ist nur ein Teil der Zwischenräume durchwachsen, so kommt es zu der bleigrauen Verfärbung des Wurzelkörpers, während die vollkommene Schwärzung dort eintritt, wo alle Interzellularen befallen sind.

Abb. 19. Ausschnitt aus einem Hypokotylquerschnitt eines Sämlings. Interzellularen teils frei und teils von Hyphen durchwachsen

In Reinkulturen des Erregers konnte nie eine Verfärbung des Myzels beobachtet werden. Somit ist anzunehmen, daß diese auf einer Wechselwirkung zwischen Wirt und Parasit beruht, und vor allem scheinen Oxydationsvorgänge beteiligt zu sein, da die oberste Schicht sowohl von Schnittflächen gesunder Rettiche, die der Luft ausgesetzt sind, als auch die Wände von Fraßgängen der Rettichfliege geschwärzt sind.

An natürlich befallenen Sämlingen wurde der Pilz nur im parenchymatischen Teil des Hypokotyls zwischen Epidermis und Zentralzylinder bis in die Keimblätter hinein gefunden (S. 84). An der Ansatzstelle der Laubblätter dagegen kommt das Myzelwachstum stets plötzlich zum Stillstand (Abb. 21), und ein Befall der oberen Organe konnte nie festgestellt werden. Andererseits ließ sich bei künstlichen Blattinfektionen steril angezogener Pflanzen die Ausbreitung des Pilzes in Form schwarzer Strichelung von der Infektionsstelle abwärts durch den Stiel und wieder aufwärts bis zum nächsten Blatt verfolgen. Grundsätzlich ist demnach auch in diesen Pflanzenteilen die Entwicklung des Parasiten möglich.

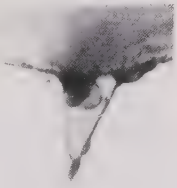


Abb. 20. Besonders deutlich in einer Interzellulare erkennbare Hyphe (720-fach)

Anatomisch ließ sich am Übergang zwischen dem Hypokotyl und den Laubblattstielen nichts feststellen, was für den Stillstand des Myzelwachstums verantwortlich zu machen wäre, aber die Ergebnisse des Pilzwachstums in Blatt- und Hypokotylabkochungen (S. 103 u. Tab. 1) könnten eine Erklärung

Abb. 21. Längsschnitt durch einen älteren Sämling. Die Keimblätter sind abgefallen, an der Ansatzstelle der Laubblätter ist das Myzelwachstum zum Stillstand gekommen

für diese Feststellung bieten, zumal wenn man beachtet, daß die Stiele der Keimblätter dem Hypokotyl näher sind als die der Laubblätter und deshalb mehr der angenommenen wachstumsfördernden Stoffe enthalten.

Eine Untersuchung von Kulturfiltraten des Pilzes auf Toxine (nach Dimond, Gottlieb, Young unabhängig von Wirt und Erreger mit abgeschnittenen Tomatensprossen) gab keinerlei Hinweise für derartige Ausscheidungen.

c) Bildung der Sexualorgane

Die Oosporen von *A. raphani* wurden von Kendrick ganz vereinzelt in den äußeren Schichten zersetzten Gewebes schwer befallener Rettiche gefunden, nie jedoch an sonstigen Stellen des Wirtes.

Von anderen *A.*-Arten, so *A. euteiches* (Jones), *A. cladogamus* (Drechsler 1929 und 1935) und *A. stellatus* (de Bary) ist jedoch bekannt, daß sie reichlich im Wirt fruktifizieren. Peters (1913) fand die Fruchtkörper von *A. laevis* an Rüben nie in den Geweben der Hauptachsen kranker und toter Sämlinge, aber nach dem Naßlegen entwickelten sie sich in großer Zahl.

Bei kranken Rettichpflänzchen aller Befallsstadien aus natürlichen Aussaaten konnte eine Oosporenbildung ebenfalls nur festgestellt werden, wenn die infizierten Teile einige Tage in Wasser gelegen hatten. Dagegen waren im Hypokotyl steril angezogener und nachträglich infizierter Sämlinge stets sehr viel Oosporen zu finden.

Wenn nun unter bestimmten Bedingungen im Wirt die Oosporenbildung stattfindet (s. auch S. 91), muß sie auch unter natürlichen Verhältnissen in den Entwicklungskreislauf des Pilzes eingeschaltet sein.

So wurden Rettiche verschiedener Sorten an allen Gewebsteilen und in unterschiedlichen Alters- und Infektionsstadien untersucht, bis schließlich in der trockenfaulen Substanz im Innern, vereinzelt auch in den äußeren Schichten und toten Nebenwurzeln kranker Knollen, Oosporen gefunden wurden.

Diese unterscheiden sich aber von allen vorher beobachteten und beschriebenen durch das Fehlen der Oogonienwand (Durchmesser daher um $^1/_4$ geringer).

Kleine feucht ausgelegte Rettichstücke (außer solchen mit scharf abgesetzter Übergangszone) waren nach ungefähr zehn Tagen dicht mit Oosporen angefüllt und von Bakterien zersetzt, während in den Ausgangs-

knollen dieser Stückchen in der gleichen Zeit nirgends Oosporenbildung stattfand und auch späterhin bis zum völligen Verfaulen des Rettichs nicht festzustellen war.

Darauf wurden von denselben Rettichen die üblichen kleinen Scheiben (S. 91) und größere Stücke ($1 \times 1^1/_2 \times 2$ cm) ausgelegt; nach zwölf Tagen waren die kleinen Teile weich und stark mit Oosporen durchsetzt, die großen dagegen nur weich.

Bei den kleinen Scheiben zeigen sich fast stets einige Tage nach dem Auslegen an allen freien Schnittflächen kurze Pilzhyphen, ein Zeichen, daß sich der Pilz im Stadium aktiven Wachstums befindet. Vielleicht sind nach dieser plötzlichen Entwicklung die Nährstoffe bald erschöpft und tritt so der nach der KLEBS'schen Annahme zur Oosporenbildung notwendige Mangelzustand ein. In den großen Isolierungsstücken und in den Ausgangsrettichen dagegen ist das Verhältnis zwischen der besonders an den Außenflächen gebildeten Pilzmasse und dem verfügbaren Nahrungsvorrat größer, und die Hyphen können v o r der Erschöpfung ihrer Nahrungsquelle von den Bakterien befallen werden.

## III. Untersuchungen über den Einfluß der Umweltbedingungen auf das Auftreten der Krankheit

Neben den Untersuchungen des Pilzes in vitro wurde auch den Beziehungen zwischen Wirt und Parasit unter verschiedenen Umweltbedingungen nachgegangen. Von ihrer Kenntnis waren Hinweise auf das Zustandekommen der Erkrankung sowie Anhaltspunkte für die Bekämpfung zu erhoffen.

### 1. Methodisches

Vorausgeschickt seien einige Angaben zur Infektionstechnik.

a) B o d e n v e r s e u c h u n g

Da die Rettichschwärze in der Nähe von Bonn nicht bekannt ist, wurde kranker Boden aus dem Stuttgarter Gebiet verwandt, und zwar teils direkt, teils mit hiesigem Gartenboden oder Quarzsand (1 : 24) vermischt.

Ferner wurde Erde verseucht durch Versetzen mit kranken Rettichstückchen (BÖNING 1932), durch Gießen mit Myzelsuspensionen (KENDRICK) und durch Einbringen von Agarkulturen. Im Infektionserfolg ließen die einzelnen Methoden keinen Unterschied erkennen.

b) B e i m p f u n g s t e r i l a n g e z o g e n e r S ä m l i n g e

Weitere Infektionsversuche wurden an steril wachsenden Einzelpflanzen vorgenommen, die nach einem von KOSSWIG (1950 mündliche Mitteilung), nach VAN KOOT abgewandelten Verfahren herangezogen waren (Abb. 22). In 3 cm weite Röhrchen wurde ein Glasgestell mit drei waagerechten Schenkeln zum Auflegen eines Papierstreifens eingehängt und das Röhrchen zu einem Viertel mit Nährlösung (S. 111) gefüllt, so daß beide Enden des Papiers in die Flüssigkeit eintauchten. Mit einem Wattestopfen verschlossen, wurde das Ganze sterilisiert und mit gebeiztem Rettichsamen (10 Minuten 0,1 % $HgCl_2$, anschließend steril ausgewaschen) beschickt. Bei einer durchschnittlichen Größe von 5 cm wurden die Pflanzen beimpft, indem kranke Rettichstücke oder bewachsene Agarblöckchen direkt an die Wurzel gelegt oder solche Agarblöckchen ½ cm von den Pflanzenorganen entfernt auf das Papier gebracht wurden. Die Infektion gelang bei allen drei Methoden gleich gut.

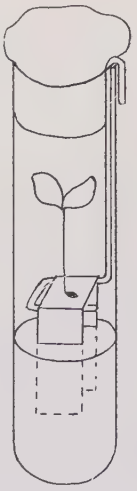


Abb. 22. Infektionsröhrchen

c) Infektionsversuche an Blättern

Beimpfungen des Laubes von solchen im sterilen Raum wachsenden Pflänzchen durch Auflegen von myzeldurchwachsenen Agarblöckchen fielen nur positiv aus, wenn die Blättchen vorher verwundet waren (S. 94), ohne Beschädigung erfolgte keinerlei Reaktion.

An größeren, im Gewächshaus gewachsenen Blättern waren auf diese Weise keine Erkrankungen zu erreichen.

d) Infektion an wachsenden Knollen

Direkte Knolleninfektionen an lebenden Pflanzen gelangen, wenn das Hypokotyl über der Bodenoberfläche nach Abwaschen mit Alkohol T-förmig eingeschnitten, unter die Ecke eines Lappens Pilzmyzel geschoben und das Ganze mit flüssigem Wachs verschlossen wurde.

e) Impfungen auf Rettichscheiben

Infektionen einzelner Rettichscheiben wurden in Feuchtkammern durch Auslegen kranker Gewebestücke oder bewachsener Agarblöckchen durchgeführt.

## 2. Der Einfluß der Borversorgung auf das Auftreten der Rettichschwärze

Zu Beginn der experimentellen Arbeit erkrankten in verseuchten Bodengemischen herangezogene Pflanzen gar nicht oder nur ganz schwach an den äußeren Zellschichten. Andererseits wiesen aus Stuttgart geschickte Rettiche im Erscheinungsbild große Ähnlichkeit mit vermutlich bormangelkranken Stoppelrüben *(Brassica rapa)* aus niederrheinischen Bezirken auf. Es lag deshalb die Möglichkeit nahe, daß die Symptome der Rettichschwärze erst durch das Zusammenwirken von zwei verschiedenen Krankheitsursachen, einer primären physiologischen und einer sekundären parasitären zustande komme.

Eine solche Annahme für die Rettichschwärze wurde gestützt durch das häufige Fehlschlagen der Isolierungen und durch Kendricks Hinweis auf bessere Erfolge, wenn die Rettiche mit Reinkulturen des Pilzes und nicht natürlich verseuchter Erde entstammten. (Kendrick scheint nur mit Boden aus dem natürlichen Verbreitungsgebiet der Rettichschwärze gearbeitet zu haben, so daß keine unbeachtete Anreicherung mit Bor stattfinden konnte.)

Schließlich sprach für die Bormangelhypothese eine mündliche Mitteilung Stuttgarter Gärtner, daß im dortigen Bezirk auch Wasserrüben *(Brassica rapa)* von der Schwärze befallen würden.

Eine hohe Empfindlichkeit von Kruziferen gegenüber der Versorgung mit diesem Spurenelement ist aus der Literatur bekannt (Bortels 1941, Brandenburg, Schropp und Arenz).

Zur Untersuchung der Borbedürftigkeit des Speiserettichs *(Raphanus sativus)* wurden Wasserkulturen mit borfreien Lösungen und Gaben von 0,25 mg, 0,5 mg und 0,75 mg Borsäure je Liter Nährlösung (v. d. Crone und Zindzaze II) angelegt.

Die ohne Bor herangezogenen Pflanzen entwickelten sich nur kümmerlich: nach 14 Tagen zeigten sich an den Blättern vergilbte Flecken, dann nahmen die Blattspreiten krüppelartig gewölbte Formen an und trockneten vom Rande aus ein. Die Flächen späterhin gebildeter Blätter waren oft nur andeutungsweise als eingerollte harte Gebilde vorhanden (Abb. 23), die wiederum vom Rande her verdorrten. Die Stiele waren unregelmäßig gewachsen, spröde und

Abb. 23. Rettiche in Wasserkultur. A bei 0,5 mg Bor, B in borfreier Nährlösung gewachsen

brachen leicht. Nach vier bis fünf Wochen trocknete auch der Vegetationspunkt ein. Knollen bildeten sich nicht, höchstens Verdickungen der Wurzeln bis 0,7 cm Durchmesser.

In den nächsten Reihen (0,25 und 0,5 mg) waren die Symptome nur schwach vorhanden, und bei 0,75 mg Bor wuchsen Pflanzen mit normaler Laub- und Knollenentwicklung.

Der Rettichschwärze ähnliche Merkmale waren nirgends festzustellen.

Später durchgeführte Impfungen auf halbierte Wurzelverdickungen aus allen Reihen gaben keine Hinweise für eine unterschiedliche Resistenz, während Rettiche aus Gefäßen der höchsten Borgabe nach Infektion durch Einstecken kranker Gewebsteilchen in den Wurzelbart die typischen bleigrauen Befallsmerkmale zeigten.

Da in der Literatur keinerlei Angaben über die Knollenbildung von Kruziferen in Wasser- wie auch in reinen Sandkulturen zu finden waren — z. B. sind die Bormangelsymptome des Rübenkörpers von *Brassica rapa* nicht wie die von *beta*-Rüben in Wasserkultur nachweisbar — wurden g l e i c h z e i t i g mit den oben beschriebenen Reihen Versuchsserien in Volkgefäßen angesetzt mit

1. reinem Quarzsand,
2. Quarzsand versetzt mit 4 % nährstoffarmem Sphagnumtorf, dem zur Neutralisation 10 g $Ca_3(PO_4)_2$ je 10 kg Gemisch beigegeben war, und
3. Quarzsand vermengt mit 4 % Stuttgarter Erde.

Alle Böden erhielten die gleiche Grunddüngung, indem je Gefäß (= 10 kg Erde) 10 g $Ca_3(PO_4)_2$ und

$$2 \text{ g } Fe_2(SO_4)_3 \times (NH_4)_2 SO_4 \times 24 H_2O$$

trocken beigemischt und die folgenden Salze gelöst in drei Gaben verabreicht wurden:

3,0 g $NH_4 NO_3$
7,5 g $KNO_3$
4,5 g KCl
4,5 g $Mg SO_4 \times 7 H_2O$
+ Spurenelemente: 5 mg $Cu SO_4 \times 5 H_2O$
5 mg $Zn SO_4 \times 7 H_2O$
10 mg $Mn SO_4 \times 4 H_2O$

Abb. 24. Ohne Bor in Sand gewachsener Rettich. Die Spreiten der älteren Blätter lassen die nekrotischen Flecke, die Einwölbung und das Eintrocknen an den Rändern erkennen. Die jüngeren Stiele zeigen die verkrüppelten und unentwickelten Fiederblattreste. Die Wurzel ist vollständig schorfig und rissig

Abb. 25. Blütenstand eines ohne Bor in Sand gewachsenen Rettichs, stark gestauchter Blütenschaft, Längsrisse am Hauptstiel, verkümmerte Blütenanlagen, Wurzel stark rissig und schorfig

Das Bor wurde in abgestuften Mengen zugesetzt, so daß in allen drei Reihen je 1/3 der Töpfe kein Bor, eine einfache (10 mg $H_3BO_3$) und eine doppelte Gabe (20 mg $H_3BO_3$) erhielt.

Von jeder Versuchsart blieb ein Teil unbeimpft, ein weiterer Teil wurde vier und der letzte sieben Wochen nach der Pflanzung mit Myzel von *A. raphani* infiziert (S. 109).

Da jedoch in diesen Gefäßversuchen die in den Wasserkulturen beobachteten Blattsymptome für Bormangel fehlten, war keine Sicherheit für vollständigen Mangel gegeben, und es wurde in gleicher Weise eine neue Versuchsreihe angesetzt, die aber nicht mit Leitungs-, sondern mit destilliertem Wasser gegossen wurde.

Diesmal zeigten sich nach drei bis vier Wochen am jungen Laub die oben charakterisierten Bormangelerscheinungen. Später färbten sich auch die älteren, zunächst normal ausgebildeten Blätter, vom Rand aus beginnend, dann auf die Interkostalflächen übergreifend, gelb, so daß schließlich nur die Haupt- und die primären Nebenadern grün waren. Die Blätter wie die übrigen oberirdischen Teile waren hart und spröde und trockneten später, an den Rändern beginnend, vollkommen ein (Abb. 24).

Wo es zur Blütenbildung bildung kam, war der Blütenschaft erheblich gestaucht und in der Längsrichtung mehrfach aufgeplatzt; die einzelnen Infloreszenzen waren nur unvollkommen ausgebildet und setzten keine Samen an (Abb. 25).

Die Knollen waren klein, stark rissig und schorfig und innen rötlichbraun verfärbt (Abb. 24 u. 25). Mit Leitungswasser gegossene Rettiche wiesen die Symptome nur sehr schwach auf.

*Aphanomyces*-Erkrankungen wurden bei allen infizierten Pflanzen ohne Zusammenhänge mit unterschiedlichen Borgaben festgestellt. Damit ist erwiesen, daß zwischen Rettichschwärze und Bormangel keine Beziehung besteht.

Wenn Woodman in borfreien Nährlösungen Rettiche mit normalem Blattwerk und genießbar großen (edible size) Knollen erhielt, ist anzunehmen, daß ihm geringe Verunreinigungen entgangen sind.

### 3. Der Einfluß des Bodens auf das Auftreten der Rettichschwärze

Wesentlich für das Ausmaß der Erkrankung scheinen mir Bodeneinflüsse zu sein. Zwar läßt sich im künstlichen Versuch das komplizierte Zusammenspiel der zahlreichen Faktoren im natürlichen Boden nie voll erfassen, doch können einzelne Faktoren isoliert und auf ihre Auswirkung auf die Krankheit geprüft werden.

a) Bodenarten

Die Untersuchungen über das Auftreten der Schwärze in verschiedenen Bodenarten wurden in Mitscherlich-Gefäßen mit gleichen Gewichtsmengen Sand, Lehm und Komposterde je mit 4 % Stuttgarter Boden infiziert und mit reinem Stuttgarter Boden ausgeführt.

Die mit Sand angesetzten Töpfe erhielten die vollständige Grunddüngung (S. 111), während in den weiteren Reihen (Lehm, Komposterde, Stuttgarter Boden) die trocken eingemischten Mittel ganz und die flüssig gegebenen Salze zur Hälfte fortfielen. Bepflanzt wurden alle Gefäße mit vorgezogenen Sämlingen, und auch die weitere Behandlung war vollkommen gleich. Bei der Ernte wurden die Rettiche zunächst nach Befallsgraden bonitiert und weiter Gesamtgewicht sowie Masse des kranken Gewebes jeder Knolle ermittelt. Letztere ist dann in Prozent der Gesamtsubstanz umgerechnet worden. Die Summe dieser Werte dividiert durch die Zahl der untersuchten Pflanzen veranschaulicht das Befallsprozent der einzelnen Versuchsreihen (dritte Spalte in Tab. 2, 3 u. 4).

Trotz der an sich niedrigen Anzahl von je zehn Versuchspflanzen ergaben sich eindeutige Unterschiede.

Wie Tabelle 2 veranschaulicht, fanden im Sand die schwersten Erkrankungen statt. Fast alle Rettiche waren stark bis mittelstark befallen, der Anteil der geschwärzten Gewebe betrug 55,8 %.

In Stuttgarter Erde waren bei einer totalen, einer mittelstarken und wenigen schwachen Infektionen die Hälfte der Knollen gesund, so daß sich ein Durchschnittsbefall von 8,4 % ergab. (Vgl. auch S. 117, Tab. 4: Sand 51 %, Stuttgarter Erde 7,5 %.)

Die Lehmgefäße zeigten bei einer totalen und zwei ganz geringen Erkrankungen nur gesunde Pflanzen. Der Mittelwert lag bei 3,5 %.

In den Kompostversuchen traten gar keine Schwärzesymptome auf.

*Tabelle 2*

Infektionsergebnisse in verschiedenen Bodenarten

| Bodenart | Gesamternte | | davon krank*) | | krank in Gewichts% |
|---|---|---|---|---|---|
| | in g | in Stck. | in g | in Stck. | |
| Sand ..... | 1419 | 10 | 794 | 9 | 55,8 |
| Stuttg. Erde ..... | 2275 | 10 | 195 | 8 | 8,4 |
| Lehm ..... | 1354 | 10 | 72 | 7 | 3,5 |
| Komposterde..... | 1797 | 10 | 0 | 0 | 0 |

*) Wesentlicher als die Zahl der kranken Pflanzen ist der Befallsgrad der einzelnen Knollen (s. Text).

Die Befunde widersprechen völlig den Erwartungen, da nach Bönings Versuchen und nach den Erfahrungen der Gärtner starke organische Düngung den Krankheitsbefall fördert.

Um den Einfluß einer etwaigen speziellen Mikroflora der einzelnen Böden weitestmöglich auszuschalten und so die physikalischen Faktoren allein zur Auswirkung gelangen zu lassen, wurden Sand, Stuttgarter Erde und Lehm in Mitscherlich-Gefäßen sterilisiert ($1^1/_2$ Atü $1^1/_2$ Stunden) und mit gleichen Mengen einer Myzelsuspension beimpft.

Es zeigte sich wiederum, daß im Sand die stärksten Infektionen stattfanden, während sie im Lehm zwar niedriger, aber doch verhältnismäßig hoch, und in der Stuttgarter Erde praktisch gleich Null waren (s. Tabelle 3).

*Tabelle 3*

Infektionsergebnisse in sterilisiertem, infiziertem Boden

| Bodenart | Gesamternte in g | davon krank in g | krank in Gewichts% |
|---|---|---|---|
| Sand ..... | 534 | 190 | 35,6 |
| Lehm ..... | 766 | 178 | 20,2 |
| Stuttg. Erde ..... | 661 | 0 | 0 |

Die Ausbreitung des Pilzes im Boden wird dementsprechend weniger durch eine spezielle Mikroflora als durch physikalische Faktoren beeinflußt. Zur näheren Bestimmung derselben wurden Infektionsstärke und Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pilzes unter natürlichen Verhältnissen untersucht.

Dazu sind markierte Infektionsherde an verschiedenen Stellen mit variiertem Ausgangsmaterial in folgender Verteilung angelegt worden:

1. auf mittelschwerem sandigem Lehm des Institutsgartens mit
   a) zerkleinerten Stuttgarter Rettichen,
   b) zerkleinerten Rettichen aus eigenen Infektionsversuchen in Sandkultur (S. 109)[1]),

[1]) Die Unterscheidung von Stuttgarter Rettichen und Pflanzen aus selbstverseuchten Sandkulturen sollte auf eventuell beim Zustandekommen der Krankheit vom Boden ausgehende Einflüsse auf das Zusammenspiel Wirt-Parasit hinweisen.

c) Stuttgarter Erde,
d) einem Sandgemisch (S. 109), in dem vorher stark erkrankte Rettiche gewachsen waren (S. 113),

2. auf schwerem feuchtem Lehm des Versuchsfeldes mit
a) zerkleinerten Stuttgarter Rettichen,
b) zerkleinerten Rettichen aus eigenen Infektionsversuchen.

Da es möglich erschien, daß der Pilz sich in bereits mit Rettichwürzelchen durchsetztem Boden stärker entwickelt, wurde

3. eine im Frühjahr mit gesunden Rettichen bepflanzte Parzelle des Institutsgartens mit Stuttgarter Rettichen infiziert.

Sämlinge aus gesunder Erde wurden dicht an jedem Herd und bis zu einer Entfernung von 0,5 m ausgesetzt. Bei der Ernte waren im Institutsgarten schwach erkrankte Knollen bis höchstens 10 cm vom Rand der Infektionsherde zu finden. Auch die vorher mit Rettichen bestandene Parzelle brachte keine abweichenden Ergebnisse.

Auf dem Versuchsfeld traten bis zu 20 cm vom Rand jedes Infektionsherdes entfernt kranke Pflanzen mit etwas größeren Schaleninfektionen auf.

Der Erkrankungsgrad war bei allen Infektionsmaterialien gleich, mit Ausnahme des Sandgemisches, das etwas stärkeren Befall zur Folge hatte. Die Unterschiede im Wachstum des Pilzes sind vermutlich weniger durch die Bodenarten als durch die Wasserverhältnisse bedingt, da es sich auf dem Versuchsfeld um schattige, feuchte Stellen handelte, während die Beete im Garten mehr der Sonne ausgesetzt und infolgedessen trockener waren. Diese Deutung wird durch die Versuche über den Einfluß der Bodenfeuchtigkeit nahegelegt.

### b) Bodenfeuchtigkeit

Nach mehrfachen Literaturangaben (Buchholtz, Jones, Leach 1946, Smith und Walker, Walker und Musbach) wird das Auftreten verschiedener *Aphanomyces*-Erkrankungen wesentlich vom Feuchtigkeitsgehalt des Bodens bestimmt.

Für *A. raphani* liegen keine derartigen Angaben vor. Aus der Praxis ist aber bekannt, daß in nassen Jahren die Rettichschwärze besonders stark auftritt. Auch gingen eigene, nach bewährten Methoden durchgeführte Infektionsversuche (S. 109) nur sehr schlecht an, wenn durch äußere Umstände der Boden leicht austrocknete.

So wurden vier Rettichsorten (Augsburger, Unus, Neckarruhm, Ostergruß) in Gefäßen in infiziertem Sandgemisch bei etwa 35- und 60prozentiger Wasserkapazität herangezogen: Alle trocken gehaltenen Pflanzen blieben gesund, die in feuchter Erde gewachsenen Kontrollen waren bis auf den rotschaligen Typ (Ostergruß) durchweg stark bis mittelstark befallen. Somit ist bewiesen, daß die Entwicklung der Rettichschwärze von der Bodenfeuchtigkeit beeinflußt wird.

c) Bodentemperatur

Eine Gegenüberstellung der im Freiland aufgetretenen schwachen Befallsgrade mit den bedeutend stärkeren Erkrankungen in den Gefäßversuchen legt es nahe, neben der Bewässerung vor allem die Bodentemperaturen hierfür verantwortlich zu machen: Die Topfversuche waren im Sommerhalbjahr im Gewächshaus durchgeführt und so relativ gleichmäßig hohen Wärmegraden unterworfen, die Freilandversuche dagegen unterlagen durch das Auspflanzen im September bald niedrigen Temperaturen.

Für die Entwicklung von *A. raphani* in vitro hatte Kendrick ein Temperaturoptimum zwischen 23 ° und 27 ° C festgestellt, während bei 9 ° C das Wachstum sistierte. Über die Entwicklung im Boden liegen keine derartigen Angaben vor, jedoch läßt sich aus Untersuchungen an *A. cochlioides* (Leach 1943 und 1946) entnehmen, daß das Optimum für die Infektion im Boden um etwa 5 ° niedriger liegt als das seiner Ausbreitung in vitro, und außerdem der Temperaturbereich für die Erkrankung enger begrenzt ist als für das Wachstum in Reinkultur.

Es ist anzunehmen, daß bei der Rettichkrankheit ähnliche Verhältnisse vorliegen und der geringe Befall der Freilandinfektionen zum Teil auf diese Weise zu erklären ist.

d) Mineralsalzdüngung

In weiteren Versuchen sollte der Einfluß der Mineralsalzdüngung auf den Krankheitsbefall geprüft werden. Hierzu liegen viele mehr oder weniger widerspruchsvolle Angaben vor.

Ein Teil der Untersuchungen spricht für eine Krankheitsverringerung durch Kräftigung des Wirtes, sei es durch eine allgemeine Verstärkung der Düngegabe (bei *A. euteiches:* Walker, Walker und Musbach, Derwiche und Mitarbeiter) oder eine Erhöhung des aufnehmbaren P (bei *A. cochlioides:* Warren, Coons und Mitarbeiter). Andere, meist die jüngeren Autoren, wollen die Wirkung der Düngesalze mehr auf eine Hemmung des Parasiten *(A. euteiches)* zurückführen (Smith und Walker, Haenseler, Garret).

Für *A. raphani* konnte Böning (1935) feststellen, daß erhöhte K- und N-Gaben das Auftreten der Rettichschwärze verringern, während organische Substanz, insbesondere Stallmist, ihr Auftreten vermehren. Danach ist anzunehmen, daß auch hier der unterschiedliche Befall weniger eine Folge der Nährstoffzufuhr, also Beeinflussung des Wirtes, als vielmehr der Änderung der physikalischen Faktoren ist, und schon Böning ist der Ansicht, die günstige Wirkung der Salze auf eine gewisse Empfindlichkeit des Erregers gegen erhöhte Konzentrationen der Bodenlösung zurückzuführen. Es war nun zu prüfen, inwieweit eine gleichmäßig zusammengesetzte, aber verschieden konzentrierte Mineralsalzdüngung als Gesamtkomplex den Krankheitsbefall beeinflußt. Die Versuche wurden in Mitscherlich-Gefäßen mit Stuttgarter Erde und infiziertem Sand (S. 109) durchgeführt (letzterem waren je 10 kg 10 g $Ca_3(PO_4)_2$ und 2 g $Fe_2(SO_4)_2 \times (NH_4)_2\ SO_4 \times 24\ H_2O$ verabreicht). Beide Reihen erhielten zu je $^1/_3$ der Töpfe die normale Salzgabe (S. 111), den vierten Teil und das $2^1/_2$fache dieser Menge in je drei Gaben.

*Tabelle 4*

Infektionsergebnisse bei abgestuften Düngegaben in verschiedenen Böden

| Bodenart | Düngung | Gesamternte in g | davon krank in g | krank in Gewichts% |
|---|---|---|---|---|
| infizierter Sand | 1/4 | 527 | 345 | 65.5 |
| „ „ | 1 | 1419 | 794 | 55,8 |
| „ „ | 2 1/2 | 1384 | 560 | 40.4 |
| | | 3330 | 1699 | 51,0 |
| Stuttg. Erde | 1/4 | 1736 | 10 | 1 |
| „ „ | 1 | 2275 | 195 | 8,4 |
| „ „ | 2 1/2 | 1922 | 179 | 9,3 |
| | | 5933 | 384 | 7,5 |

In den Sandversuchen trat eindeutig die krankheitshemmende Wirkung verschieden starker Salzkonzentrationen zu Tage (Tab. 4). Bei 1/4 der üblichen Düngung waren 80 % der Rettiche vollkommen geschwärzt, 10 % mittelstark erkrankt und 10 % gesund. Daraus errechnet sich (S. 113) eine Befallszahl von 65,5 %. Von den normal gedüngten Pflanzen waren 40 % total, 50 % mittelstark und 10 % gar nicht infiziert; der Mittelwert liegt bei 55,8 %. Bei der 2 1/2fachen Salzkonzentration waren 10 % vollkommen schwarz, 80 % mittelstark bis stark und 10 % gar nicht erkrankt. Das entspricht einem Vergleichswert von 40,4 %.

Die Versuche in Stuttgarter Erde zeigten nicht derartig eindeutige Ergebnisse.

Bei 1/4 Düngung waren 20 % mittelstark, 30 % ganz schwach und 50 % der Rettiche gar nicht infiziert: Der Befallswert liegt niedriger als 1 %. Die normal gedüngten Pflanzen erbrachten 10 % vollkommen schwarze, 10 % mittelstark und 30 % gar nicht erkrankte Wurzeln, während die restlichen 50 % nur geringfügige graue Schalenflecke aufwiesen, so daß sich ein Mittelwert von 8,4 % ergab. Bei der 2 1/2fachen Gabe waren 10 % der Knollen total und 20 % schwach befallen, während 70 % gesund blieben. Die Befallszahl stieg wieder auf 9,3 %.

Elektrometrische pH-Messungen aller Boden- und Düngearten ergaben Werte zwischen pH 6,7 und 7,8, Beziehungen zur Befallsstärke waren nicht erkennbar.

Ein Vergleich der Durchschnittszahlen der drei Abstufungen bei Stuttgarter Erde 7,5 % und bei Sand 51 % mit den klaren Unterschieden innerhalb der Sandreihe rechtfertigt die Annahme, daß in der Stuttgarter Erde durch den Gehalt an organischer Substanz die Salze stärker abgepuffert und die Konzentration der Bodenlösung herabgesetzt war.

Hieraus lassen sich vermutlich auch die Befallsunterschiede in Sand, Stuttgarter Erde, Lehm und Komposterde (S. 113) erklären. Ferner könnte

der erhebliche Anstieg des Krankheitsgrades in Lehm nach der Sterilisation auf einer Veränderung der Absorptionskomplexe des Bodens durch die Hitzebehandlung beruhen. Insbesondere geht aus den Düngungsversuchen hervor, daß offenbar nicht die spezifische Wirkung des einzelnen Mittels entscheidend ist, sondern die Konzentration der Bodenlösung. Somit scheint durch verstärkte Salzgaben in erster Linie die Entwicklung des Pilzes beeinflußt zu werden. In diese Richtung weist auch die Beobachtung, daß oft in Reihen mit an sich niedrigem Befall bei denselben Sorten und derselben Behandlung einzelne stark erkrankte Pflanzen auftraten. Läge eine Verschiebung der Resistenz des Wirtes vor, so müßte erwartet werden, daß diese für alle Pflanzen derselben Versuchsstufe gleichsinnig ist. Bei einer Änderung der Aggressivität des Erregers dagegen erscheint es durchaus möglich, daß gelegentlich einzelne Teile des Pilzes in günstigere Infektionsbereiche kommen und sich dann im Wirt entsprechend ausbreiten können. Diese Art der Wirkung von Mineralsalzen könnte auch den Widerspruch zwischen Böning (1935) und Kotte klären: letzterer warnt vor einseitiger N-Versorgung, Böning dagegen empfiehlt eine erhöhte N-Gabe. Nach den eigenen Versuchen scheint die Wirkung des N vor allem von der Form des Düngemittels und der damit verbundenen Konzentrationsänderung der Bodenlösung abzuhängen.

### 4. Der Einfluß des Wirtes auf das Auftreten der Rettichschwärze

Kendrick und Böning haben eine große Zahl von Wirtssorten auf ihre Anfälligkeit gegenüber der Rettichschwärze untersucht. Die gefundenen Unterschiede werden von Kendrick auf die Art der Knollenbewurzelung zurückgeführt, da er nur die Durchbruchswunden der Nebenwurzeln als die Eingangspforte für den Pilz ansieht.

Doch waren nach Böning (1932) und nach eigenen Feststellungen auch an hypokotylen, unbewurzelten Knollenteilen Infektionen zu beobachten, die mit keiner sichtbaren äußeren Beschädigung in Zusammenhang standen.

Mit der „Pfortentheorie" ist ferner nicht zu erklären, weshalb die langen Wintersorten, die kaum weniger seitlich bewurzelt sind als die Frühjahrssorten, unter geringerem Befall als letztere leiden.

Soweit in den eigenen Versuchen mit verschiedenen Sorten gearbeitet wurde, konnten die Bewertungen der genannten Autoren bestätigt werden. So erkrankte z. B. in allen Gefäßreihen, in denen je ein Unus und ein Augsburger Treibrettich in denselben Topf gepflanzt waren, die lange Art stets stärker als die ovale. Die halblange Sorte Neckarruhm erwies sich als besonders anfällig, und der rote Frühjahrstreibrettich blieb vollkommen gesund.

Die Gegenüberstellung einer weißen und einer farbigen Frühjahrssorte sowie einer weißen Sommer- und Herbstsorte sollte klären, inwieweit die Resistenz auf der Schale als solcher oder auf besonderen Inhaltsstoffen der Knollen beruht.

Scheiben von
Neckarruhm (halblang, weiß, Treibsorte),
Münchener Bier (oval, weiß, Herbstsorte) und
Frühjahrsrettich (halblang bis lang, rot, Treibsorte)
wurden unter sterilen Bedingungen mit *A. raphani* beimpft.

Beim Anwachsen des Pilzes und seiner ersten Ausbreitung konnten keine Unterschiede festgestellt werden. Weitere Untersuchungen mit ganzen Knollen führten nicht zum Ziele, da die Treibsorten bei der schonenden Reinigungsmethode (zwei Tage in fließendes Leitungswasser gesetzt und mit sterilem Wasser nachgespült), um Verwundungen der Schale zu vermeiden, vorzeitig von Fäulnis befallen wurden.

Somit kann, wenn auch vorerst nur aus den weitgehend unnatürlichen Scheibeninfektionen, geschlossen werden, daß in diesen Fällen die Resistenz durch den anatomischen Bau oder durch Hemmstoffe der Schale und nicht des Knolleninnern bedingt war.

Andererseits liegt es bei der unterschiedlichen Anfälligkeit der Winter-, Frühjahrs- und Sommersorten nahe, Zusammenhänge mit dem morphologischen Aufbau sowie der stofflichen Zusammensetzung des Knollenfleisches anzunehmen. Eine spezielle Rolle könnte der Allylsenfölgehalt spielen (bei Kruziferen werden Beziehungen zur Widerstandsfähigkeit gegenüber Kohlhernie angenommen, GÄUMANN S. 327).

Zur Altersresistenz wurde festgestellt, daß lediglich in den frühesten Keimlingsstadien keine Krankheitssymptome zu beobachten waren, während Bodeninfektionsversuche an zwei bis acht Wochen alten Pflanzen gleich gut gelangen. Auch Impfungen auf Rettichscheiben gingen in gleicher Weise an, ob der Pilz auf junge, turgeszente Randpartien oder auf alte, schon etwas pelzige Gewebe aus dem Knolleninnern gebracht wurde.

## IV. Untersuchungen zur Bekämpfung der Rettichschwärze

Die Versuche in verschiedenen Bodenarten, bei variierter Feuchtigkeit und bei abgestufter Düngung geben auch die Möglichkeit, die Eignung einiger von BÖNING zur Bekämpfung der Rettichschwärze empfohlener Maßnahmen zu beurteilen. Darüber hinaus wurde versucht, neue diesbezügliche Gesichtspunkte zu gewinnen.

### 1. Kulturmaßnahmen

BÖNING warnt vor starkem Gießen der Rettichbeete. Nachdem die Gefäßversuche den Einfluß der Bodenfeuchtigkeit klar bewiesen haben, sollte besonders darauf geachtet werden, daß für den Anbau des Rettichs nicht ständig nasse oder während der vorangegangenen Periode stark bewässerte Stellen gewählt werden.

BÖNING fordert weiter geregelten Fruchtwechsel mit ein-, besser zwei- bis dreijährigem Aussetzen des Rettichanbaues. Nach Erfahrungen der Praxis

ist von Fruchtwechsel nur bei sehr schweren Ausfällen durch besonders gehäuften Anbau eine Wirkung zu erwarten, während leichterer Befall ohne vorausgegangenen Rettichanbau auftreten kann. Kendrick hat ebenfalls die Krankheit auf Böden festgestellt, die vorher als Wiesen genutzt waren und im ersten Jahr der gärtnerischen Nutzung kranke Rettiche hervorbrachten.

Es liegt der Gedanke nahe, daß *A. raphani* wie *A. euteiches* (Linford) und *A. cochlioides* (Buchholtz 1944) auch andere Pflanzen befallen kann. Die letztgenannten Pilze verursachen zwar auf vielen ihrer Nebenwirte keine auffallenden Krankheitssymptome, so daß der Befall lediglich der Erhaltung des Parasiten zugute kommt. Wenn Kendrick bei Prüfung von sechs verschiedenen Pflanzenarten keine Anzeichen des Schwärzebefalls feststellte, darf darin nicht der Beweis gesehen werden, daß der Pilz nicht doch auf anderen Pflanzen zu parasitieren vermag und sich auf diese Weise erhält und verbreitet.

Die niedrigen Befallsprozente der Rettiche im Humusboden schließlich legen es nahe, die Praxis hierauf besonders hinzuweisen. Das organische Material darf freilich nicht als Stallmist zugesetzt werden, sondern vielleicht als Gründüngung oder Torf, ohne daß über die Höhe der wirksamen Humusgabe etwas gesagt werden kann.

### 2. Samenbeizung

Zattler berichtet über günstige Ergebnisse einer Ceresan-Naßbeizung des Saatgutes gegen Ausfälle durch die Rettichschwärze. Da aber die Krankheit nicht durch den Samen übertragen wird (Böning 1932), andererseits aber Zattler durch die Beizung auch eine Herabsetzung von Rettichfliegenschäden erreicht hatte, müßte die genannte Wirkung auf einer Stimulation des Pflanzenwachstums beruhen. Obwohl in der Literatur gelegentlich über eine derartige Wirkung berichtet wird (bei *A. euteiches:* Sharvelle und Mitarbeiter), war sie nach den Ergebnissen der Mineralsalzdüngung (S. 117) und Mitteilungen von Buchholtz *(A. cochlioides)* nicht zu erwarten.

Zur Nachprüfung, ob und wieweit bei den Zattler'schen Versuchen eine Stimulation der Pflanzen vorliegt und sich auswirkt, wurden das quecksilberfreie Mittel Chinosol und das quecksilberhaltige Ceresan verwendet.

Der Anregung Zattlers folgend, sind außer der von ihm geprüften, relativ resistenten Sorte Münchener Bier noch verschiedene andere Sorten hinzugezogen worden.

Die Beizung wurde durchgeführt durch Eintauchen der Samen in 2%ige Chinosollösung (35 Minuten) oder nach Zattler in 2,25%ige Ceresanlösung (30 Minuten) oder durch Schütteln mit Ceresan-Trockenbeize (10 Minuten). Die naß gebeizten Samen waren vor der Aussaat an der Luft getrocknet. Im einzelnen ist die angewandte Behandlung aus der Tabelle 5 ersichtlich.

*Tabelle 5*
Beizversuche an verschiedenen Rettichsorten

| Rettichsorten | Ceresan naß | Ceresan trocken | Chinosol | Kontrolle |
|---|---|---|---|---|
| 1. Augsburger Treibrettich (halblang, oval, weiß) | 0 975 g IV | | 0 1250 g III-IV | 1 1250 g IV |
| 2. Unus (lang, oval, weiß, Treibs.) | 3-4 1275 g 0 | | 3-4 975 g III | 4 1175 g II |
| 3. Neckarruhm (halbl., weiß, Treibsorte) | 2 1675 g I | 1 1300 g 0-I | | 1 1700 g 0-I |
| 4. Münchener Bier (oval, weiß, Herbstsorte) | 0 725 g I-II | 2 800 g I | | 0 1050 g II-III |
| 5. Frühjahrsrettich (halblang, dunkelrot) | 0 2250 g 0 | | | 0 1675 g 0 |
| 6. Sommerrettich (halbl., rot, Sommersorte) | 0 1500 g 0 | | | 0 1800 g I |

Bonitierungsschema: 0 = gesund
1 = schwach befallen
2 = mittelstark befallen
3 = ziemlich stark befallen
4 = stark befallen
I—IV = Rettichfliegenschaden

Die Sorten 1 und 2 sollten vor allem über die Wirkung der einzelnen Mittel, die Sorten 3 und 4 über den Unterschied zwischen Naß- und Trockenbeizung Aufschluß geben, während mit den Sorten 5 und 6 nur eine Erweiterung der ZATTLER'schen Untersuchungen beabsichtigt war.

Die Versuche wurden durchgeführt in Betonkästen, die bis zu 40 cm Tiefe Stuttgarter Boden enthielten.

Entsprechend der Tabelle 5 waren die gebeizten wie die Kontrollreihen vielfach gar nicht oder nur schwach erkrankt. Lediglich die Sorte Unus zeigte starke Infektionen, aber die kaum nennenswerte Befallserniedrigung bei der Ceresan- und der Chinosolbeizung gegenüber der unbehandelten Reihe, die ebenso bei der Sorte Augsburger Treibrettich festzustellen war, wurde durch eine gleiche unwesentliche Befallserhöhung in den gebeizten Reihen gegenüber den Kontrollen bei den Sorten Neckarruhm und Münchener Bier wieder aufgehoben. (Die Knollenerträge lassen ebenso keinerlei Zusammenhänge der Beizung mit gesteigertem Pflanzenwachstum erkennen, und auch die Schäden der Rettichfliege wurden in den vorliegenden Versuchen durch diese Behandlung nicht beeinflußt.) Somit muß vorerst die Samenbeizung als Maßnahme gegen die Rettichschwärze abgelehnt werden.

### 3. Sorten

Obgleich im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen keine ausgesprochenen Sortenprüfungen vorgesehen waren, zeigte sich wiederum, daß durch zweckentsprechende Sortenwahl eine erhebliche Einschränkung der Verluste durch die Rettichschwärze zu erreichen ist. Nach Mitteilungen aus der Praxis scheint aber diese Möglichkeit noch wenig bekannt oder zum mindesten wenig ausgenutzt zu sein.

Allerdings steht dem im Wege, daß zur Zeit auf dem Markt gerade die langen weißen, also hochanfälligen Varietäten bevorzugt werden, so daß zunächst eine Beeinflussung der Geschmacksrichtung des Konsumenten angestrebt werden müßte.

## C. Zusammenfassung

1. Die Rettichschwärze verursacht alljährlich in Süddeutschland erhebliche Schäden.
2. a) Die Isolierung des Erregers ist mit großen Schwierigkeiten verbunden.
   b) Sie gelingt nur aus bestimmten Zonen kranker Knollen und Sämlinge.
   c) Eine besondere Desinfektions- und Isolierungsmethode konnte ausgearbeitet werden.
3. Die Reinkultur des Pilzes wurde mit Hilfe von van-Tieghám-Kammern erreicht.
4. a) In vitro zeigt *A. raphani* eine große Empfindlichkeit gegenüber der Zusammensetzung des Nährbodens, die durch vergleichende Untersuchungen mit weiteren *Aphanomyces*-Arten klar zum Ausdruck kommt.
   b) Die Wuchsform wird weitgehend durch den Nährboden beeinflußt. Auf Hafermehl-Agar bildet der Pilz flaches, kaum sichtbares Substratmyzel und reichlich Oosporen.
   Auf X-Agar entwickelt sich kräftiges Luftmyzel, das in dieser Form für *Aphanomyces*-Arten bisher nicht beschrieben wurde. Es zeichnet sich durch eine kurze Lebensdauer von nur fünf bis sechs Tagen aus. Die Oosporenbildung ist auf X-Agar gehemmt.
   In flüssigen Nährböden bildet der Pilz bei bestimmter Zusammensetzung kräftiges vegetatives Myzel mit Zonen verschiedener Dichte, bei anderer Zusammensetzung schwaches vegetatives Myzel sowie Zoo- und Oosporen.
   c) Die Keimung der Oosporen wurde erstmalig beobachtet. Sie kann nach $1^1/_2$monatiger Ruhezeit eintreten.
5. Die Rettichschwärze steht in keinem Zusammenhang mit der Bornernährung der Wirtspflanze.
6. Hoher Wassergehalt des Bodens begünstigt, geringer hemmt das Auftreten der Schwärze.
7. Der Krankheitsbefall ist in infiziertem Sand erheblich stärker als in Komposterde und Lehm, die in der gleichen Weise behandelt wurden, und in Boden aus dem natürlichen Verbreitungsgebiet des Pilzes.
8. Starke Mineraldüngung kann eine Einschränkung des Befalls bewirken, die auf die Erhöhung der Salzkonzentration zurückzuführen ist.
9. Mit Ausnahme der frühesten Keimlingsstadien werden Rettiche in jedem Alter von der Krankheit befallen.
10. Zur Bekämpfung der Krankheit hat sich Saatgutbeizung als zwecklos erwiesen.
11. Lediglich durch Kulturmaßnahmen, wie Standortswahl, Fruchtwechsel, Düngung und Sortenwahl, kann eine gewisse Herabminderung der Ausfälle durch die Rettichschwärze erreicht werden.

## Literaturverzeichnis


Appel, O., Untersuchungen über die Schwarzbeinigkeit und die durch Bakterien hervorgerufene Knollenfäule der Kartoffel. Arb. a. d. biol. Reichsanst. **3**, 1903, 396.

Ark, P. A. and Dickey, R. S., A modification of the van Tiegham cell for purification of contaminated fungus cultures. Phytopath. **40**, 1930, 389.

Barret, J. T., A serious root disease of radish. Phytopath. **2**, 1912, 96.

Bary, A. de, Einige neue *Saprolegniaceen*. Jahrb. f. wiss. Bot. **2**, 1860, 169—192.

Böning, K., Das Schwarzwerden der Rettiche. Prakt. Bl. f. Pflanzenbau u. -schutz **10**, 1932, 205—219.

— —, Düngungsmaßnahmen zur Bekämpfung des Schwarzwerdens der Rettiche. Prakt. Bl. f. Pflanzenbau u. -schutz **13**, 1935, 261—269.

— —, Maßnahmen zur Bekämpfung des Schwarzwerdens der Rettiche und der Halsfäule des Kopfsalates. Pflanzenschutz **1**, 1949, 155.

Bortels, H., Meteorologische Untersuchungen an *Azotobakter*. Zentralbl. Bakt. II. **102**, 1940, 129—153.

— —, Die Bedeutung der Spurenelemente für Entstehung und Verhütung von Pflanzenkrankheiten. Nachr. Bl. dtsch. Pflanzenschutzdienst **21**, 1941, 69—72.

— —, Über Beziehungen zwischen epidemiologischem Geschehen unter besonderer Berücksichtigung der Inhibinwirkung. Zentralbl. Bakt. II. **104**, 1942, 289—323.

Brandenburg, E., Über Bormangel an Blumenkohl und Kohlrabi. Angew. Bot. **24**, 1942, 99—113.

Buchholtz, W. F., Crop rotation and soil drainage effects on sugar beet tip rot and susceptibility of other crops to *Aph. cochlioides*. Phytopath. **34**, 1944, 805—812.

— —, *Aph. cochlioides* infestation in irrigated sugar beet-alfalfa rotation plots at Newell. Phytopath. **38**, 1948, 4.

— — and Meredith, C. H., *Aph. cochlioides* on sugar-beets. Phytopath. **28**, 1938, 4.

Conners, 18 annual report of the Canadian plant disease survey. Rev. Appl. Myc. **18**, 1939, 725.

Coons, G. H., Kotila, J. E., Bockstahler, H. W., Black root of sugar beets and possibilities for its control. Biol. Abs. **24**, 1950, 10641.

Dimond, A. E., Symptoms of Dutch elm disease produced by toxins of *Graphium ulmi* in culture. Phytopath. **37**, 1937, 7.

Drechsler, C., The beet water-mold and several related root parasites. Journ. agr. Res. **38**, 1929, 309—361.

— —, Occurrence of a species of *Aph.* on roots of spinach and flax. Phytopath. **25**, 1935, 14—15.

— —, Two *hyphomycetes* parasitic on oospores of root-rotting oomycetes. Phytopath. **28**, 1938, 81.

Edson, H. A., Seedling disease of sugar beets and their relation to root-rot and crown-rot. Journ. agr. Res. **4**, 1915, 135—168.

Garret, S. D., Root disease fungi. Waltham, Mass. USA 1944.

Gäumann, E., Pflanzliche Infektionslehre. Birkhäuser, Basel 1946.

Gottlieb, D., The mechanism of wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. Phytograph. **34**, 1944, 47.

Haenseler, C. M., Use of fertilizers in reducing losses from pea root-rot by *Aph. euteiches*. Phytopath. **21**, 1931, 116.

Jones, F. R. and Drechsler, C., Root rot of peas in the United States caused by *Aph. euteiches* (n. sp.). Journ. agr. Res. **30**, 1925, 293—325.

Kasanowsky, V., *A. laevis* de Bary, I. Entwicklung der Sexualorgane und Befruchtung. Ber. Drsch. bot. Ges. **29**, 1911, 210—227.

Kendrick, J. B., The black-root disease of radish. Purdue Univ. agr. Exp. Station. Bull. 311, 1927.

Klebs, G., Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. Pringsh. Jahrb. 1899, 520—561.

Koot, I. V. van, De Fusariumziekte van komkommer en melon. Meded. Tuinbouwoorlichtingsd. **42**, 1944, 10.

Kotte, W., Krankheiten und Schädlinge im Gemüsebau und ihre Bekämpfung. Paul Parey, Berlin. 1944.

Leach, D., Relation of temperature and soil reaction to the water mold seedling disease of sugar beets. Phytopath. **33**, 1943, 7.

— —, Growth rates of host and pathogens as factors dementing the severity of preemergence damping-off. Journ. agr. Res. **75**, 1946, 161—178.

Linford, M. B., Additional hosts of *Aph. euteiches*, the pea root-rot fungus. Phytopath. **17**, 1927, 133—134.

Link, G. K. K. and Gardner, M. W., Market pathology and market diseases of vegetables. Phytopath. **9**, 1919, 519.

Niethammer, A., Die mikroskopischen Bodenpilze. S'Gravenhage 1937.

Peters, L., Zur Kenntnis des Wurzelbrandes der Zuckerrübe. Ber. Dtsch. bot. Ges. **24**, 1906, 323—329.

— —, Über die Erreger des Wurzelbrandes der Rübe. Arb. Biol. Reichsanst. **8**, 1913, 211—260.

Plakidas, A. G., A convenient method for isolation slow-growing pathogenic fungi from plant tissues. Phytopath. **38**, 1948, 928—930.

Reinking, O. A. and Marshall, M. M., Parasitic and other fusaria counted in Colombia soils. Zentralbl. Bakt. II, **82**, 1934, 504.

Remy, E., Über niedere Boden*phycomyceten*. Arch. Mikrobiol. **14**, 1950, 212.

Richter, W., Vorarbeiten zu einer *Saprolegniaceen*flora von Marburg. Flora **131**, 1936/37, 227—262.

Rippel, A., Über den Einfluß des wachsenden Barometerstandes auf den Verlauf der alkoholischen Gärung und biologischer Vorgänge überhaupt. Zentralbl. Bakt. **II**, **47**, 1917, 225—229.

Rippel-Baldes, A., Grundriß der Mikrobiologie. Springer, Göttingen 1947, 230.

Schick, R. und Lehmann, H., Zur physiologischen Spezialisierung von *Phytophthora infestans* de Bary. Züchter **8**, 1936, 36.

Schropp, W. und Arenz, B., Über die Wirkung des Wachstums einiger Öl- und Gespinstpflanzen. Forschungsdienst **6**, 1938, 564—574.

Schultz, H., Arbeitsmethoden bei Kultur- und Infektionsversuchen mit *Pythium*arten. Zentralbl. Bakt. **105**, 1942, 248—254.

Sharvelle, E. G., Young, H. C. and Shema, B. E., The value of spergon as a seed protectant for canning peas. Phytopath. **32**, 1942, 944—952.

Sleeth, B., Agar medium and technic for isolating *pythium* free of bacteria. Phytopath. **35**, 1945, 1030, 1031.

Smith, R., Studies on 2 strains of *Aph. laevis* found ocurring as wound parasites on Craifish. Mycologia **32** *(2)*, 1940, 205—213.

Smith, P. G. and Walker, J. C., Certain environmental and nutrial factors affecting *Aph.* root rot of garden pea. Biol. Abs. 1941, 24358.

Walker, J. C., Relation of soil fertility to incidence of *Aph.* root-rot of pea. Phytopath. **23**, 1933, 36.

— — and Musbach, F. L., Effect of moisture fertility and fertilizer placement on root rot of canning peas in Wisconsin. Journ. agr. Res. **59**, 1939, 579—590.

Warren, J. R., A study of the sugar beet seedling disease in Ohio. Phytopath. **38**, 1948, 883.

Woodman, R. M., The nutrition of the radish. Biol. Abs. 1944, 11479.

Young, R. A., Studies on oak wilt caused by *Chalara quercina.* Phytopath. **39**, 1949, 425—441.

Zattler, F., Ein Beizversuch zur Bekämpfung des Schwarzwerdens der Rettiche. Pflanzenschutz **2**, 1950, 53.

Ziegler, A. W., A comparative study of zygote germination in the *saprolegniaceae.* Biol. Abs. **23**, 1949, 8391.

Die Untersuchungen und Zusammenstellung der vorliegenden Arbeit wurden am Institut für Pflanzenkrankheiten der landwirtschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn durchgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. H. Braun, danke ich herzlich für die Ermöglichung und stete Förderung meiner Arbeit. Ebenfalls möchte ich Herrn Dr. W. Kosswig für die mannigfachen Ratschläge zur Durchführung der Arbeit meinen Dank zum Ausdruck bringen. Auch Herrn Professor Dr. E. Brandenburg bin ich für verschiedene Hinweise zu Dank verpflichtet.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik*
*der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*
*Direktor: Prof. Dr. Ernst Gäumann*

# Über Welkestoffbildung bei *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc.

Von

E. Landolt

*Mit 1 Abbildung*

*Fusarium culmorum* verursacht Keimlingskrankheiten und Ähren- und Wurzelfusariosen bei Getreidearten und kann auch die Blätter der befallenen Pflanzen zum Welken bringen.

Zu unserer Untersuchung wurden zwei Stämme mit den E.T.H.-Nummern 4086 und 4229 *(var. cereale)* verwendet, die einander in ihrer Welkewirkung entsprechen. Den Pilz kultivierten wir auf Raulin-Lösung, die von allen ausprobierten Nährlösungen hinsichtlich der Welkestoffbildung die besten Resultate ermöglichte. Die Kulturen wurden in einer Schüttelmaschine bei ungefähr 24 ° C gehalten. Blätter von 23 Pflanzenarten*) wurden durchgetestet und zeigten alle Welkesymptome. Tomaten- und Honigkleeblätter erwiesen sich dabei am empfindlichsten und als relativ gut ablesbar. Ebenso versuchten wir den *Ustilago*sporentest und Bakterienteste. Bei Sporen von *Ustilago zeae* tritt durch Einwirkung von Kulturfiltrat nur geringe Hemmung auf. Von 39 im Bouillontest geprüften Bakterien wurden 28 zumindest in starken Filtratkonzentrationen gehemmt. Am besten eignet sich hier *Bacillus subtilis* und *Bacterium mycoides*. Zur Ausführung sämtlicher Teste wurden die Filtrate auf ein pH von 4,5 eingestellt.

Das Resultat der Welkestoffproduktion ist in der folgenden Kurve zusammengestellt, wobei die Abszisse das Alter der Kulturen bedeutet, deren Filtrat verwendet wurde, während die Ordinate den *log* derjenigen Konzentrationen bezeichnet, die gerade noch das Welken von 50 % der gesamten getesteten Blattflächen oder die Hemmung des Bakteriums bewirkt.

Die beiden Maxima der Kurve für die Welkewirkung auf Tomatenblätter lassen vermuten, daß der Pilz nacheinander zwei Welkestoffe bildet, wovon der eine nicht auf Honigkleeblätter und *Bacillus subtilis* wirkt (es

*) Hafer, Gerste, Weizen, Roggen, Reis, *Dactylis glomerata, Arrhenatherum elatius, Carex fusca, Corydalis lutea, Bromus sterilis, Allium Schoenoprasum, Fragaria sp., Alchemilla sp., Medicago lupulina, Melilotus albus, Trifolium pratense, Petroselinum hortense, Foeniculum vulgare, Anethum graveolens, Vicia sepium, Solanum Lycopersicum, Bryonia dioica, Taraxacum officinale.*

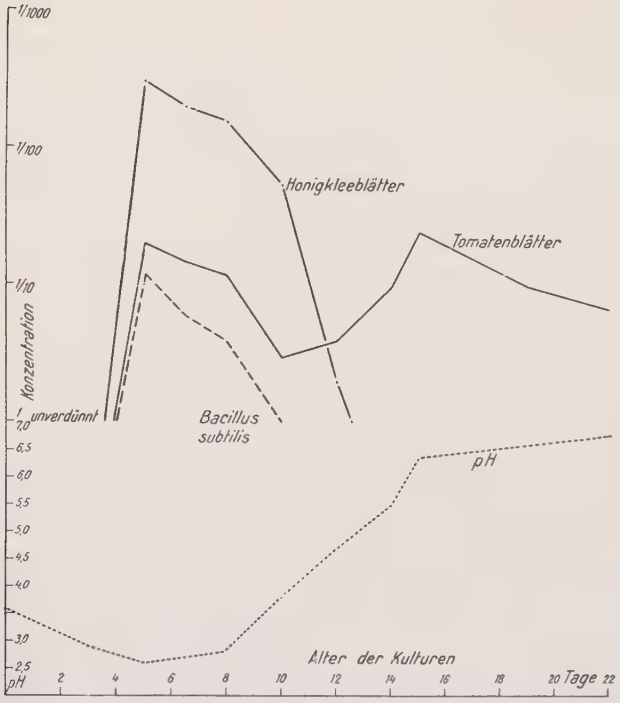



Abb. 1

Die Toxinwirkung der Filtrate 1- bis 22tägiger *Fusarium culmorum*-Kulturen auf Tomatenblätter (drittoberstes Blatt von Trieben zwei Monate alter Tomatenpflanzen), Honigkleeblätter *(Melilotus albus)* und *Bacillus subtilis.* Darunter sind die pH-Werte gleichaltriger Kulturen aufgezeichnet

wurde für diesen zweiten Stoff überhaupt kein anderes empfindliches Testobjekt gefunden). Die durch die beiden Stoffe verursachten Welkebilder sind qualitativ ganz verschieden. Der zuerst gebildete Stoff wirkt nekrotisch auf die Blattspreiten, deren Fiedern von den Rändern her absterben und sich einrollen. Blattstiel und Mittelnerv der Blattfiedern bleiben steif und grün. Ältere Tomatenblätter sind empfindlicher als jüngere. Beim zweiten Stoff handelt es sich mehr um einen Erschlaffungsstoff, der vor allem auf noch nicht ausgewachsene, junge Blätter wirkt. Diese werden mitsamt den Stielen schlaff und sterben ab, ohne Nekroseflecken zu zeigen.

*Fusarium culmorum* bildet drei bekannte Stoffwechselprodukte: die beiden Farbstoffe Aurofusarin und Rubrofusarin und die farblose und neutrale Substanz Culmorin (Ashley, Hobbs and Raistrick 1937; Nord and Mull 1945). Alle drei sind in Wasser völlig unlöslich. Es galt nun zu untersuchen, inwieweit diese drei Stoffe als Ursache der Welkewirkung in Frage kommen könnten. Die beiden Stämme, die ich benutzte, bildeten kein Culmorin und nur wenig Rubrofusarin, welch letzteres deshalb nicht extrahiert werden konnte. Da zudem unter den in der Literatur zur Culmorin- und Rubrofusarinbildung angegebenen Bedingungen nie eine Welkewirkung auftrat, dürften

diese beiden Stoffe als Welkegifte nicht in Betracht kommen. Aurofusarin ist ein Dimethyläther und wurde in größeren Mengen aus dem Pilzmyzel gewonnen. Über Chloroform- und Ammoniaklösungen konnten wäßrige kolloidale Lösungen erhalten werden, die aber keine Welkewirkung hervorriefen. So muß diese wohl in anderen Stoffen ihre Ursache haben.

Von den beiden zur Diskussion stehenden Welkeprinzipien wurde das vom Pilz zuerst gebildete etwas näher untersucht:

Viertelstündiges Erhitzen des Filtrates einer sieben Tage alten Kultur bei pH 4,5 verändert das Welkevermögen der Lösung nicht. Wird die Lösung indessen 30 Minuten bei pH 10 stehengelassen, so verschwindet der Welkeeffekt. Der Welkestoff wird also durch hohes pH inaktiviert. Längeres Stehenlassen der Lösung bei Zimmertemperatur inaktiviert dieselbe ebenfalls; hingegen läßt sie sich bei 3 ° C mehrere Monate aktiv erhalten. Das Welkeprinzip läßt sich durch Schütteln wenigstens teilweise in folgende organische Lösungsmittel überführen: Äthylalkohol, Azeton, Chloroform, Essigester und Äther, nicht aber Petrol. Außerdem kann es aus Wasser an Aktivkohle vollständig adsorbiert und mit Alkohol oder Azeton durch längeres Schütteln wieder herausgelöst werden.

## Literaturverzeichnis

Ashley, I. N., Hobbs, B. C. and Raistrick, H., 1937, The crystalline colouring matters of *Fus. culmorum* and related forms (Biochem. Journ., **31**, S. 3).

Nord, F. F. and Mull, R. P., 1945, Recent progress in the biochemistry of Fusaria (Advances in Enzymol., **5**, 165—205).

*Aus dem Staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg i. Br.*

# Bormangel bei der Weinrebe *Vitis vinifera* L.

## Krankheitsbild, Verbreitung und Versuche zur Behebung von Bormangel in Weinbergen

Von

A. F. Wilhelm

*Mit 21 Abbildungen*

### 1. Einleitung

Den Anlaß für die nachstehenden Untersuchungen gab das Auftreten schwerer Rückgangserscheinungen in verschiedenen Weinbergen des Kaiserstuhls. Geradezu katastrophal machten sie sich auf dem ehemaligen Versuchs- und Lehrgut der Badischen Landwirtschaftskammer, dem heutigen Staatsweingut Blankenhornsberg[1]) bei Ihringen am Kaiserstuhl bemerkbar. Welches Ausmaß die Schäden hier, in besten Weinbergslagen, angenommen haben, ist aus den weiter hinten mitgeteilten Tabellen ersichtlich. Man wird feststellen, daß sich der Weinbau auf den am meisten betroffenen Flächen nicht mehr lohnen würde, wenn dem Fortschreiten der Rückgangserscheinungen nicht wirksam begegnet werden könnte. Große Teile des Gutes hätten vermutlich das gleiche Schicksal erlitten wie die früheren Rebanlagen auf dem Eichberg in Oberrotweil. Hier mußte der Weinbau in guter Lage gegen Ende des vorigen Jahrhunderts aufgegeben werden, weil die Reben trotz guter Düngung und Pflege rasch im Ertrag nachließen und großenteils eingingen. Die „Eichbergkrankheit" ist den älteren Winzern dieser Gemeinde noch so lebhaft in Erinnerung, daß man seither nicht mehr den Versuch gemacht hat, den Berg erneut mit Reben zu bepflanzen, obwohl er sich für andere Zwecke wenig eignet und in unmittelbarer Nähe des Dorfes gelegen ist. Der Boden ist auf dem Eichberg der gleiche wie auf dem Blankenhornsberg. Die Symptome der „Eichbergkrankheit" entsprechen nach Schilderungen der Winzer ganz denen, die für die Rückgangserscheinungen auf dem Blankenhornsberg charakteristisch sind. Eigene Feststellungen in Beständen, die rings am Rande der aufgelassenen Fläche stehen, lassen es als sicher erscheinen, daß der „Eichbergkrankheit" die nämliche Ursache zugrunde liegt wie den auf dem Blankenhornsberg vorhandenen Wachstumsstörungen. Wie später gezeigt wird, sind

[1]) Benannt nach Adolph Blankenhorn, geb. 1843, gest. 1906. Er hat in Karlsruhe 1872 das erste önologische Institut Deutschlands errichtet, die erste internationale ampelographische Kommission ins Leben gerufen und kann als Begründer der deutschen Weinbauwissenschaft gelten.

die gleichen Krankheitserscheinungen ziemlich weit verbreitet und auf Bormangel zurückzuführen.

## 2. Vorversuche

Das am Blankenhornsberg und an anderen Stellen des Kaiserstuhls vorhandene Krankheitsbild ist mir seit meiner Tätigkeit in Baden, von 1938 ab, bekannt. Es lohnt sich nicht, auf alle Vermutungen, die über die Ursache der Krankheit von anderer Seite geäußert wurden, einzugehen. Ich habe mich, unterbrochen durch die Kriegsjahre, bis 1947 auf mehr gelegentliche Beobachtungen und Feststellungen beschränken müssen. Danach konnte als sicher gelten, daß Pilze, Bakterien oder tierische Schädlinge, vor allem die Kräuselmilbe *(Epitrimerus vitis)*[2]) als Ursache ausscheiden. Auch um die sogenannte Reisigkrankheit konnte es sich trotz mancher gemeinsamer Züge nicht handeln, da das dafür als am typischsten angegebene Merkmal, das gehäufte Vorkommen intrazellulärer Stäbchen, fehlt oder nur selten gefunden wurde. Von vornherein war anzunehmen, daß eine vom Boden ausgehende Störung vorliegen würde. Die Versorgung mit Kernnährstoffen konnte jedoch keine Rolle spielen; denn nach den vorgenommenen Analysen ist die Nährstoffversorgung als gut anzusehen. Die Bodenreaktion ist allerdings mit pH 7,9 bis 8,3 in KCl und pH 8,4 in Wasser ziemlich alkalisch. Die hohen pH-Werte des Bodens sowie die Aufhellung und teilweise Ausbleichung der Blätter konnten auf eine Störung des Eisenstoffwechsels hinweisen. Allerdings mußte es sich dann um eine andere Art Chlorose handeln als die, welche bei der Rebe in nassen Jahren auf Kalkböden gewöhnlich auftritt; denn die hier vorhandene Krankheit tritt in verschärfter Form gerade in trockenen Jahren in Erscheinung. Ferner konnte an eine Art Dörrfleckenkrankheit, also an Manganmangel gedacht werden. Da neuerdings im Obstbau auch Zinkmangel als Ursache von Wachstumsstörungen — wenn auch anderer Art — festgestellt wurde, hat man auch Zinkmangel in Betracht gezogen. Die größte Wahrscheinlichkeit bestand jedoch dafür, daß Bormangel vorliegen würde. Dafür sprach zunächst, daß die Krankheit am schlimmsten in trockenen Jahrgängen auftrat, und ferner die Tatsache, daß der Kalkgehalt der Vulkanböden des Kaiserstuhls sehr groß ist, beides Momente, die auch das Auftreten der Herz- und Trockenfäule der Rüben, der klassischen Bormangelkrankheit, in hohem Maße begünstigen. Das

[2]) Zwischen der Kräuselkrankheit, die auch als Kurzknotigkeit bezeichnet wird, und den in Rede stehenden Rückgangserscheinungen besteht bei oberflächlicher Betrachtung eine gewisse Ähnlichkeit. Wie der Name sagt, sind bei der Akarinose die Blätter zum Teil gekräuselt und das Holz kurzknotig. Der Stock nimmt infolge starker Geiztriebentwicklung besenartiges Aussehen an. Es überrascht daher nicht, wenn von verschiedenen Winzern, in deren Anlagen sich Bormangel zeigte, die Meinung geäußert wurde, daß die Kräuselkrankheit die Ursache des schlechten Wachstums sei. Die Aufhellung der Blattflächen (vergl. dazu Abb. 5 S. 132) bestärkte in dieser Ansicht. Das Hauptargument, das von einem namhaften Weinbaufachmann vorgebracht wurde, war die Beobachtung einer teilweisen Erholung einer bormangelkranken Anlage, wenn mit Schwefelkalkbrühe oder Solbar — gegen die Kräuselkrankheit — gespritzt worden war. Die Besserung kann natürlich witterungsbedingt gewesen sein. Man kann allerdings auch an die Möglichkeit denken, daß sich von dem Spritzbelag her Säuren des Schwefels bilden, die im Blatt oder im Boden zu einer Mobilisierung von Bor führen.

wichtigste Indiz für Bormangel war aber die besonders 1947 häufig gemachte Beobachtung, daß die Triebspitzen der am stärksten erkrankten Stöcke und oft auch die Vegetationspunkte der Geiztriebe abstarben. Für Bormangel ist bekanntlich das Absterben der Vegetationspunkte besonders charakteristisch („Top-ziekte" bei Tabak, ebenso bei Tomate und Kartoffel, Herzfäule der Rübe). Auch die Versuche von W. Maier (1937), der in Wasserkulturen mit Rebsämlingen die Unentbehrlichkeit von Bor für die Rebe festgestellt und bei Vorenthalten von Bor Absterben der Triebgipfel beobachtet hat, wiesen in die gleiche Richtung.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde im Juli 1948 jeweils eine Zeile mit 30 Stöcken mit Borsäurelösung 0,05 %, Boraxlösung 0,05 % und mit einer kombinierten Lösung, die in 100 Liter 50 g Manganchlorid, 50 g Zinksulfat und 50 g Eisen(2)sulfat enthielt, bespritzt. Eine sichere Wirkung war im Laufe des Spätsommers und Herbstes nicht zu erkennen. Man hatte jedoch Mitte September den Eindruck, daß die mit Borsäure- und Boraxlösung behandelten Pflanzen etwas frischer und mehr dunkelgrün aussehen würden als unbehandelte Vergleichszeilen.

Ein weiterer, am 19. Juli 1948 derart angelegter Versuch, daß jeweils zehn Stöcke mit 10 g, 20 g und 30 g Borsäure, mit 100 g und 300 g Manganchlorid pro Stock gedüngt und die Salze untergehackt wurden, brachte ebenfalls im gleichen Jahr keinen überzeugenden Erfolg, wiewohl auch hierbei eine Besserung durch die Borbehandlung, besonders wo 20 und 30 g verabreicht worden waren, angedeutet zu sein schien. Vor der Darlegung der späteren Versuche, aus denen eindeutig hervorgeht, daß die in Frage stehenden Wachstumsstörungen durch Bormangel verursacht sind, ist eine nähere Beschreibung des Krankheitsbildes angebracht.

Abb. 1. An Bormangel schwer erkrankte Silvanerrebe, Stadium 3
*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 50*

Abb. 2. Rebzeile mit bormangelkranken Stöcken
*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 50*

Abb. 3. Silvanerblatt, infolge Bormangel mosaikartig aufgehellt
*Bild: Blankenhornsberg 27. 7. 1950*

Abb. 4. Silvanerblatt, infolge Bormangel fleckig aufgehellt
*Bild: Oberrotweil 25. 7. 1951*

Abb. 5. Müller-Thurgaublatt, infolge Bormangel partiell stark aufgehellt
*Bild: Blankenhornsberg 27. 9. 1951*

Abb. 6. Müller-Thurgaublatt, Ausbleichung infolge Bormangel
*Bild: Blankenhornsberg 27. 9. 1951*

### 3. Krankheitsbild der Rebe bei Bormangel

Das Krankheitsbild, welches Reben bei Bormangel unter natürlichen Verhältnissen zeigen, stimmt in den Grundzügen mit dem überein, das auch von anderen Pflanzen her bekannt ist. Hauptmerkmale sind hier wie dort: Nachlassen im vegetativen Wachstum, Störung der Frucht- und Samenbildung, Absterben der Vegetationspunkte. Bei der Rebe kommen noch eigenartige

Blattverfärbungen hinzu, denen diagnostischer Wert beizumessen ist. — Je nach dem Grad der Erkrankung lassen sich drei verschieden schwere Stadien abgrenzen, wobei Übergänge selbstverständlich nicht fehlen.

Schwer kranke Stöcke kümmern auffallend, sind „abgängig", wie der Winzer sagt, und gehen zumeist über kurz oder lang ein (Abb. 1, 2). Mehr oder weniger zahlreiche Fehlstellen sind in schwer betroffenen Anlagen gewöhnlich die Folge. Der Austrieb ist im Frühjahr schwach. Oft treiben an einem Bogen nur wenige Augen. Die ersten Blätter sind gewöhnlich noch normal grün gefärbt, bleiben aber in der Größe zurück. Zumeist vom vierten Blatt ab hellt sich die Laubfarbe mosaikartig gefleckt auf (Abb. 3, 4). Die Blätter sind dabei oft gewellt. Mit dem Größerwerden der Blätter wird die Laubfarbe zwischen den Nerven und in der Randzone fortschreitend heller und bleicht schließlich völlig aus (Abb. 5, 6). Nur schmale Zonen längs der Haupt- und Seitennerven behalten ihr Blattgrün. Die nahezu rein weiß verfärbten Stellen sterben vielfach unter Braunverfärbung mehr oder weniger weitgehend ab (Abb. 7). Die Nekrosenbildung kann dabei am Blattrand oder mehr in der Mitte der Spreite einsetzen. Oft bleiben die Randpartien intakt. Völliges Absterben derartig verfärbter Blätter wurde ganz selten beobachtet. Sie bleiben vielmehr bis zum Herbst am Stock. Der Laubfall setzt aber früher ein. Mitunter ist der Blattrand, besonders bei der Sorte Silvaner, nach unten gebogen, so daß die Blätter gewölbt erscheinen (Abb. 8). Auf schwer gezeich-

Abb. 7. Müller-Thurgaublatt, infolge Bormangel ausgebleicht, am Rand Nekrosen *Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 1950*

Abb. 8. Trieb von bormangelkranker Silvanerrebe, Spitzenwachstum eingestellt, Doppelauge, Geiztriebe stark entwickelt, Blätter ausgebleicht oder marmoriert, nach unten gewölbt *Bild: Blankenhornsberg 27. 9. 51*

neten Blättern kommt es nicht selten zu einer stellenweisen Bräunung der feinsten Nerven und zur Bildung punktgroßer Knötchen, die unter der Lupe wie Intumeszenzen aussehen und zu Verwechslungen mit Stichstellen führen können. Auffällig ist noch ein gewisser Glanz der verfärbten Blätter. Man hat auch oft den Eindruck, daß sie dicker sind und sich lederartig anfühlen. Die Triebe sind, dem schwachen Wachstum entsprechend, dünn und enggliedrig. Häufig entstehen sogenannte Doppelaugen, d. h. das internodiale Glied fehlt ganz und die Knoten sind so eng aneinandergerückt, daß sich Blätter und Augen nahezu auf gleicher Höhe gegenüberstehen (Abb. 8, 9). Nicht selten sind an einem Trieb mehrere Doppelaugen vorhanden. In dieser Hinsicht sehen sich reisigkranke und an Bormangel leidende Stöcke weitgehend ähnlich. Intrazelluläre Stäbchen sind jedoch im letzteren Fall höchst selten zu finden. Gewöhnlich von Ende Juni an wird oft das Längenwachstum der Triebe ganz eingestellt. Dabei können die Spitzen absterben (Abb. 10, 11, 13). Die zuletzt angesetzten Blätter verkümmern dann und fallen ab. In den Herbstmonaten kann es zu einer Wiederaufnahme des Wachstums kommen und Seitentriebe übernehmen dann das Spitzenwachstum. Dadurch, daß der obere Teil der Hauptrute kahl und der neue Teil gewöhnlich gestaucht ist, sieht dann der Triebgipfel büschelartig aus. Mit der Hemmung des Längenwachstums der Triebe geht ein vorzeitiges Austreiben der Geizen parallel. Solche Ruten nehmen dadurch ein buschartiges Aussehen an (Abb. 8, 12, 13).

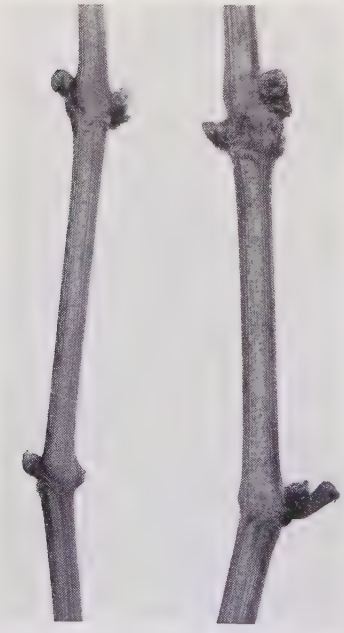


Abb. 9. Doppelaugen an bormangelkranker Silvanerrebe

Abb. 10. Triebende von bormangelkranker Silvanerrebe, Spitzen der Haupt- und Geiztriebe abgestorben

*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 1950*

Abb. 11. Gipfel von Silvanertrieb; Spitze des Haupttriebes, darüber Spitze des Geiztriebes infolge Bormangel abgestorben
*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 1950*

Oben rechts:

Abb. 12. Bormangelkranke Silvanerrebe, Trieb gestaucht, Spitzenwachstum eingestellt, starke Geiztriebentwicklung, Blätter marmoriert
*Bild: Oberrotweil 25. 7. 1951*

Abb. 13. Trieb von bormangelkranker Silvanerrebe, Traube durchgerieselt, einzelne Blätter mit Ausbleichungen, buschiges Wachstum, Triebspitze abgestorben
*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 1950*

Abb. 14. Infolge Bormangel verrieselte Silvanertrauben
*Bild: Blankenhornsberg 12. 7. 1950*

Auch die Vegetationspunkte der Geiztriebe sterben nicht selten ab (Abb. 10, 11). An schwer erkrankten Stöcken unterbleibt die Ausbildung von Blütenansätzen („Gescheinen") meistens ganz. Sind aber Gescheine ausnahmsweise vorhanden, dann bräunen sie sich um die Blütezeit und fallen als Ganzes ab. Sie „wachsen ab", wie der Winzer sagt. —

Weniger schwer erkrankte Stöcke bleiben gegenüber augenscheinlich gesunden im Wachstum zwar noch deutlich zurück, die Triebe sind jedoch nicht mehr auffällig gestaucht und enggliedrig. Doppelknoten findet man aber verhältnismäßig häufig. Zu einem Absterben der Vegetationspunkte kommt es dagegen nicht mehr. Die mosaikartige Zeichnung ist aber an jüngeren Blättern stets vorhanden. Einzelne Blätter zeigen auch noch Ausbleichungen des Blattgrüns, jedoch nur selten noch Nekrosen (Abb. 13). Nicht immer weisen die Blätter an allen Trieben eines Stockes gleichstarke Verfärbungen auf. Es kommt vor, daß der eine oder andere Trieb lediglich noch Mosaikfleckung zeigt oder daß sich die Ausbleicheerscheinungen nur auf Teile von Blättern beschränken. Ebenso haben oft nur einzelne Triebe eines Stockes ein gestauchtes Wachstum und ein buschiges Aussehen, während die anderen sich äußerlich normal entwickeln. Daß aber auch dieses mittlere Krankheitsstadium noch eine schwere Wachstumsstörung bedeutet, zeigt sich vor allem an den reproduktiven Organen. Gescheine werden zwar gebildet, sind aber meistens weniger zahlreich und kleiner als bei

Abb. 15. Durchgerieselte Gescheine von Silvanertrieb
*Bild: Auggen 31. 7. 1951*

gesunden Stöcken. Die Einzelblütchen fallen außerdem großenteils ab, die Gescheine „verrieseln" also stark. Nur einzelne Blütchen entwickeln sich zu normal großen Beeren. In der Hauptsache bilden sich nur stecknadelkopfgroße, zumeist kernlose Beerchen (Abb. 13, 14, 15).

Abb. 16. Silvanerblatt, rechte Hälfte mosaikartig gefleckt *Bild: 27. 6. 1950*

Schwacher Bormangel ist augenscheinlich nur noch an der hell-dunkelgrünen Marmorierung vor allem der jüngeren Blätter zu erkennen. Sie kann bald an vielen, bald nur an einzelnen Blättern zu sehen sein. Oft zeigen sie auch nur Teile eines Blattes (Abb. 16). Inwieweit in diesem Falle das Wachstum und der Ertrag beeinträchtigt sind, läßt sich im Weinberg, wo die individuellen Schwankungen meistens sehr groß sind, nicht leicht exakt feststellen. Es ist aber vorgesehen, auch diese in wirtschaftlicher Hinsicht bedeutsame Frage noch zu klären.

## 4. Versuche zum Nachweis von Bormangel als Ursache der Krankheitserscheinungen

Vor einer Betrachtung der im folgenden mitgeteilten Versuche muß daran erinnert werden, daß vor vier Jahren als sie begonnen wurden, lediglich die Wahrscheinlichkeit bestand, es könne sich um eine Bormangelkrankheit handeln. Wie weiter vorn bereits dargelegt, stützte sich diese Vermutung hauptsächlich auf analoge Krankheitsbilder, die andere Pflanzen bei Bormangel zeigen. Aus der damaligen Situation heraus erklärt sich das anfangs mehr tastende Vorgehen, insbesondere was die Höhe der angewandten Borgaben anbelangt. Es ist zu berücksichtigen, daß über die Empfindlichkeit der Rebe gegenüber Bor, das immerhin ein starkes Pflanzengift ist, nichts bekannt war, und daß zu hohe Gaben unter Umständen unliebsame Folgen haben konnten.

Um genaue Unterlagen über die Wirkung der Borzufuhr zu erhalten, erwies es sich zunächst als notwendig, von einer bestimmten Fläche Stock für Stock in eine Liste einzutragen und den jeweiligen Gesundheitszustand oder Erkrankungsgrad zu vermerken. In Rebanlagen, die unter Bormangel leiden, sind nämlich nicht alle Stöcke gleichmäßig erkrankt, sondern meistens stehen äußerlich gesunde neben solchen, die Krankheitszeichen verschiedenen Grades aufweisen. Die Bonitierung der Stöcke geschah nach vier Stufen: Augenscheinlich gesunde Stöcke wurden mit „G" vermerkt. „1" bezeichnet den

schwächsten Krankheitsgrad; nämlich nur mosaikartige Fleckung. Unter „2" wurden die Stöcke geführt, bei denen außer der Mosaikzeichnung nur einzelne Blätter Ausbleichungen zeigten und die Trauben unvollkommen waren. Das Wachstum der Stöcke brauchte dabei nicht auffällig beeinträchtigt zu sein. Die Kennziffer „3" erhielten Stöcke, die an einer größeren Zahl Blätter Ausbleichungen aufwiesen, im Wachstum deutlich zurückgeblieben waren und zumeist keinen oder ganz geringen Behang hatten. Auch „abgängige" Stöcke, soweit sie noch einige, wenn auch kümmerliche Triebe zeigten, wurden in dieser Gruppe geführt. Außerdem wurden noch vermerkt junge, d. h. nachgepflanzte Stöcke, die noch nicht im Ertrag waren, mit „J", Fehlstellen, d. h. eingegangene Stöcke mit „F".

## *Versuch 1*

Blankenhornsberg, Lage Gaishalde, Tephritverwitterungsboden. Silvaner veredelt auf Berlandieri × Riparia Kober 5 BB und Teleki 8 B. Drahtanlage, Pflanzjahr 1935 und 1936, Pflanzweite 1,20 × 1,10 m.

Der Versuch wurde als Tastversuch begonnen und umfaßte je zehn Stöcke von 13 nebeneinander liegenden Zeilen. Am 19. Juli 1948 erhielten Zeile 1 75 g, Zeile 3 150 g Nitrophoska, Zeile 5 10 g, Zeile 7 20 g, Zeile 9 30 g Borsäure, Zeile 11 100 g, Zeile 13 300 g Manganchlorid pro Stock, und zwar rings um den Stamm gestreut. Da im folgenden Jahr nur die Borbehandlung Wirkung erkennen ließ, erhielten am 15. November 1949 die Zeilen 6, 7, 8, 9, 10 6 g, am 27. Juni 1950 3 g, sowie am 27. April 1951 nochmals 3 g Borsäure pro Stock. Hierbei wurde breitwürfig gestreut, da bei dem seitlich weitreichenden Wurzelsystem der Rebe ein Zwischenraum von nur einer Zeile zur Abgrenzung der einen von der anderen Parzelle nicht weit genug ist. Die Wirkung der Bordüngung geht aus Tabelle 1 hervor.

*Tabelle 1*

Zu Versuch 1: Durchschnittlicher Krankheitsgrad der Zeilen in den Jahren 1948—1951, mit und ohne Bordüngung

| Zeilen Nr. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Boniti:rung am: 19. 7. 48 | 2,0 | 2,3 | 2,1 | 2,0 | 2,2 | 2,4 | 2,2 | 2,3 | 2,2 | 1,9 | 2,4 | 2,0 | 2,2 |
| 2. 8. 49 | 1,5 | 1,3 | 1,3 | 1,3 | 1,1 | 1,2 | 0,8 | 1,1 | 0,7 | 1,4 | 2,0 | 2,0 | 1,7 |
| 27. 6. 50 | 1,6 | 1,9 | 1,1 | 1,3 | 0,9 | 0,3 | 0,0 | 0,1 | 0,0 | 0,4 | 0,7 | 1,8 | 1,2 |
| 29. 8. 50 | 1,2 | 1,6 | 0,8 | 0,9 | 0,4 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,1 | 1,1 | 1,8 | 1,1 |
| 27. 9. 51 | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,5 | 1,3 | 0,1 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 1,5 | 1,7 |
| | | | | | | mit Bor gedüngt | | | | | | | |

Für die zahlenmäßige Darstellung wurden die Bewertungsziffern der Einzelstöcke von jeder Zeile addiert und die erhaltene Summe durch die Anzahl Stöcke dividiert. Der Quotient, der sich zwischen 0 = gesund und 3 = „schwer krank" bewegt, gibt den Erkrankungsgrad der betreffenden Zeile an. Zum Beispiel kommt der am 19. Juli 1948 mit 2,2 festgestellte Erkrankungsgrad der Zeile 7 so zustande, daß ein Stock mit 1 (= leicht krank),

sechs Stöcke mit 2 (= mittelstark krank) und drei Stöcke mit 3 (= schwer krank) zu bezeichnen waren. $\frac{(1 \times 1) + (6 \times 2) + (3 \times 3)}{10} = 2{,}2$). Der am 2. August 1949 erhaltene Wert von 0,8 der gleichen Zeile ergibt sich daraus, daß jetzt fünf Stöcke gesund (= 0), drei leicht krank (= 1) und je ein Stock mittelstark krank (= 2) und schwer krank (= 3) waren. $\frac{(5 \times 0) + (3 \times 1) + (1 \times 2) + (1 \times 3)}{10} = 0{,}8$).

Der Tabelle 1 läßt sich folgendes Ergebnis entnehmen: Die erste Bordüngung am 19. Juli 1948 zeigte im Herbst des nächsten Jahres nur bei den Gaben von 20 und 30 g je Stock eine deutliche Wirkung. Im Herbst 1949 sind die Krankheitserscheinungen ganz allgemein gegenüber dem Vorjahr etwas gemildert. Noch mehr ist dies 1950 der Fall. Im Herbst 1951 dagegen ist wieder eine leichte Verschlechterung eingetreten. Es bestätigt sich somit auch für die Rebe die bei anderen Pflanzen, insbesondere den Beta-Rüben gemachte Erfahrung, daß sich Bormangelerscheinungen bald stärker, bald schwächer zeigen. Selbst im Laufe ein und desselben Jahres kann sich das Krankheitsbild ändern, wie die Bewertungen am 27. Juni und 28. August 1950 erweisen. — Im Jahre 1950 ist der Erfolg der Borbehandlung ganz offensichtlich: In den Zeilen 7, 8 und 9 sind alle Stöcke gesund, in den Zeilen 6 und 10 ist jeweils nur noch ein Stock vorhanden, der die leichtesten Symptome erkennen läßt. Zeile 5 hat nur einmal 10 g Borsäure erhalten. 1950 sind hier die Bormangelsymptome weitgehend zurückgegangen, 1951 treten sie wieder verstärkt hervor. In Zeile 5 hat der erste Stock am Weg auf die Bordüngung überhaupt nicht angesprochen. Er war auch 1951 noch schwer krank. Wie Ausgrabungen ergeben haben, ist das Wurzelwerk stark rückgängiger Stöcke weitgehend verkümmert. Es kann in diesem Fall sehr gut sein, daß der Wurzelstrang, der den Stock am Leben erhält, entweder sehr tief geht oder sich außerhalb der behandelten Fläche, in diesem Falle unter dem Weg oder nach Zeile 4 hin erstreckt. 1951 sind die Zeilen 6 bis 11 wieder völlig gesundet. Zeile 11 ist zwar nicht direkt gedüngt worden, sie hat aber sicher von der behandelten Nachbarzeile profitiert. Bei der seitlichen Ausbreitung der Wurzeln ist dies ohne weiteres verständlich. Außerdem trägt die reguläre Bodenbearbeitung mit dazu bei, daß sich die Parzellengrenzen verwischen. Auch beim Ausbringen der Borgaben muß mit einer gewissen Streuwirkung gerechnet werden. — Schädigungen sind selbst durch die verhältnismäßig hohe Gabe von 30 g bzw. 42 g Borsäure je Stock von Zeile 9 im Verlauf von vier Jahren nicht eingetreten.

### *Versuch 2*

Blankenhornsberg; anderes Teilstück von derselben Anlage wie zu Versuch 1. Er umfaßt 15 Zeilen mit je (regulär) 30 Stöcken.

Am 13. August 1949 erhielten die Zeilen 5 und 6 3 g Borsäure, die Zeilen 8 und 9 5 g Borax und Zeile 10 10 g Borax je Stock. Ursprünglich bestand die Absicht, die Wirkung von Borsäure im Vergleich mit der von Borax zu prüfen. Sie wurde aufgegeben und die spätere Behandlung breit-

*Tabelle 2*

Zu Versuch 2: Krankheitsstand vor und nach Düngung mit Bor

| Zeilenfolge | Stockzahl in der Zeile | Erkrankungsgrad: Summe der Bonitierungspunkte pro Zeile | Erkrankungsgrad: Durchschnitt der Bonitierungspunkte pro Zeile | a. am 10. 9. 49. b. am 27. 9. 51. | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 27 | 47 | 1,74 | a. | |
| | 25 | 36 | 1,44 | b. | |
| 2 | 30 | 49 | 1,63 | a. | |
| | 29 | 31 | 1,07 | b. | ohne Bordüngung |
| 3 | 27 | 39 | 1,44 | a. | |
| | 27 | 39 | 1,44 | b. | |
| 4 | 29 | 44 | 1,51 | a. | |
| | 29 | 21 | 0,73 | b. | |
| 5 | 27 | 45 | 1,66 | a. | |
| | 27 | 4 | 0,15 | b. | |
| 6 | 30 | 50 | 1,66 | a. | |
| | 30 | 2 | 0,067 | b. | |
| 7 | 29 | 62 | 2,14 | a. | |
| | 29 | 0 | 0 | b. | mit Bordüngung |
| 8 | 28 | 56 | 2,00 | a. | |
| | 30 | 0 | 0 | b. | |
| 9 | 21 | 45 | 2,14 | a. | |
| | 28 | 0 | 0 | b. | |
| 10 | 25 | 52 | 2,08 | a. | |
| | 27 | 1 | 0,037 | b. | |
| 11 | 26 | 56 | 2,15 | a. | |
| | 27 | 24 | 0,89 | b. | |
| 12 | 29 | 64 | 2,20 | a. | |
| | 29 | 39 | 1,34 | b. | |
| 13 | 26 | 50 | 1,92 | a. | ohne Bordüngung |
| | 27 | 40 | 1,48 | b. | |
| 14 | 23 | 43 | 1,87 | a. | |
| | 25 | 35 | 1,40 | b. | |
| 15 | 25 | 52 | 2,08 | a. | |
| | 26 | 34 | 1,31 | b. | |

würfig über die Zeilen 5 bis 10 mit Borsäure durchgeführt. Am 15. November 1949 und am 27. Juni 1950 wurden je 2,5 g und am 27. April 1951 nochmals 3 g Borsäure pro Stock gestreut. Im Durchschnitt trafen somit auf einen Stock 11 g Borsäure.

Bonitierungen wurden am 10. September 1949 (= Zustand vor der Behandlung), am 29. August 1950 und am 27. September 1951 vorgenommen. Von einer Wiedergabe der Einzelstock-Bewertung muß aus Raumgründen abgesehen werden. In Tabelle 2 sind die Durchschnittswerte der Erkrankungsgrade von jeder Zeile nach dem Stand im September 1949 und 1951 aufgeführt. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, wie oft die einzelnen Krankheitsstadien in jeder Zeile vor und nach der Boranwendung vertreten waren.

*Tabelle 3*

Zu Versuch 2: Anzahl Stöcke der Krankheitsstadien 0 bis 3 je Zeile, vor und nach Düngung mit Bor

| Zeilenfolge | Stand am 10. 9. 1949 | | | | | | Stand am 27. 9. 1951 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | jung | Fehlstellen | gesund | Krankheitsstadien 1 | 2 | 3 | jung | Fehlstellen | gesund | Krankheitsstadien 1 | 2 | 3 | |
| 1 | — | 4 | 3 | 7 | 11 | 6 | — | 6 | 2 | 12 | 9 | 2 | ohne Bordüngung |
| 2 | — | 1 | 6 | 6 | 11 | 7 | — | 2 | 7 | 16 | 3 | 3 | |
| 3 | 3 | 1 | 5 | 9 | 9 | 4 | 3 | 1 | 1 | 17 | 5 | 4 | |
| 4 | — | 2 | 8 | 4 | 11 | 6 | — | 2 | 13 | 12 | 3 | 1 | |
| 5 | 4 | — | 3 | 6 | 15 | 3 | 4 | — | 23 | 4 | — | — | mit Bordüngung |
| 6 | 1 | — | 6 | 3 | 16 | 5 | — | 1 | 28 | 2 | — | — | |
| 7 | 1 | 1 | — | 3 | 19 | 7 | — | 2 | 29 | — | — | — | |
| 8 | 3 | — | — | 3 | 22 | 3 | 1 | — | 30 | — | — | — | |
| 9 | 7 | 3 | — | — | 18 | 3 | 2 | 1 | 28 | — | — | — | |
| 10 | 2 | 4 | — | 2 | 19 | 4 | — | 4 | 26 | 1 | — | — | |
| 11 | 5 | — | — | 3 | 16 | 7 | 3 | 1 | 10 | 12 | 3 | 2 | ohne Bordüngung |
| 12 | 1 | 1 | | 5 | 13 | 11 | — | 2 | 7 | 8 | 11 | 3 | |
| 13 | 3 | 2 | 2 | 3 | 16 | 5 | 2 | 2 | 3 | 14 | 4 | 6 | |
| 14 | 5 | 3 | 1 | 3 | 17 | 2 | 2 | 4 | 1 | 14 | 9 | 1 | |
| 15 | 3 | 3 | — | 4 | 15 | 6 | — | 5 | 3 | 14 | 7 | 2 | |

Die Tabellen lassen erkennen, daß sich 1951 ebenso wie im Versuch 1 der Krankheitszustand gegenüber 1949 im allgemeinen etwas gebessert hat. Die Wirkung der Bordüngung tritt aber ganz klar hervor. Die Krankheitsstadien 2 und 3 sind in den Zeilen 5 bis 10 völlig verschwunden. Von anfangs 151 kranken Stöcken, davon 134 schwer kranken, zeigen nur noch sieben leichte Symptome von Bormangel. Die Randwirkung der Bordüngung macht sich in den Zeilen 4 und 11 wieder deutlich bemerkbar.

## *Versuch 3*

Der Versuch ist in derselben Anlage wie Versuch 2, anschließend an diesen durchgeführt worden. Die Zeilen 19 bis 23 und 30 bis 35 blieben unbehandelt. Auf den Zeilen 24 bis 29 wurden am 15. November 1949, am 27. Juni 1950 und am 27. April 1951 jeweils 5 g Borsäure je Stock, insgesamt also 15 g Borsäure je Stock, gestreut. Wie die Tabellen 4 und 5 zeigen, ergab sich grundsätzlich das gleiche Resultat wie in Versuch 2. Die Wirkung war allerdings nicht ganz so durchschlagend wie dort, obwohl die Borgabe hier insgesamt etwas größer war. Der Grund dafür ist in erster Linie darin zu suchen, daß bei Versuch 2 in den sechs behandelten Zeilen 25, in Versuch 3 dagegen 48 schwer erkrankte Stöcke (Stadium 3) ursprünglich vorhanden waren. Vielleicht hat sich aber auch der Termin der Bordüngung geltend gemacht, indem bei Versuch 2 die bereits am 13. August 1949 verabfolgte erste Gabe einen Vorsprung in der Erholung dieser Reben sicherte.

*Tabelle 4*

Zu Versuch 3: Krankheitsstand vor und nach Düngung mit Bor

| Zeilenfolge | Stockzahl in der Zeile | Erkrankungsgrad: Summe der Bonitierungspunkte pro Zeile | Erkrankungsgrad: Durchschnitt der Bonitierungspunkte pro Zeile | a. am 10. 9. 49. b. am 27. 9. 51. | |
|---|---|---|---|---|---|
| 19 | 24 | 51 | 2,12 | a. | |
| | 24 | 27 | 1,12 | b. | |
| 20 | 25 | 56 | 2,24 | a. | |
| | 25 | 32 | 1,28 | b. | |
| 21 | 29 | 60 | 2,06 | a. | ohne Bordüngung |
| | 29 | 42 | 1,45 | b. | |
| 22 | 25 | 50 | 2,00 | a. | |
| | 24 | 30 | 1,25 | b. | |
| 23 | 23 | 47 | 2,04 | a. | |
| | 23 | 23 | 1,00 | b. | |
| 24 | 25 | 59 | 2,36 | a. | |
| | 24 | 8 | 0,33 | b. | |
| 25 | 25 | 54 | 2,16 | a. | |
| | 24 | 14 | 0,58 | b. | |
| 26 | 25 | 55 | 2,19 | a. | |
| | 25 | 9 | 0,36 | b. | mit Bordüngung |
| 27 | 27 | 54 | 2,00 | a. | |
| | 26 | 7 | 0,27 | b. | |
| 28 | 29 | 52 | 1,79 | a. | |
| | 29 | 3 | 0,10 | b. | |
| 29 | 28 | 49 | 1,57 | a. | |
| | 28 | 6 | 0,21 | b. | |
| 30 | 29 | 49 | 1,69 | a. | |
| | 29 | 17 | 0,59 | b. | |
| 31 | 32 | 56 | 1,75 | a. | |
| | 30 | 30 | 1,00 | b. | |
| 32 | 30 | 56 | 1,86 | a. | |
| | 32 | 35 | 1,09 | b. | ohne Bordüngung |
| 33 | 28 | 61 | 2,17 | a. | |
| | 28 | 44 | 1,57 | b. | |
| 34 | 28 | 61 | 2,17 | a. | |
| | 28 | 43 | 1,53 | b. | |
| 35 | 30 | 64 | 2,13 | a. | |
| | 26 | 40 | 1,54 | b. | |

## *Versuch 4*

Dazu wurde in der gleichen Anlage, in welcher die vorhergehenden Versuche durchgeführt sind, ein Teilstück ausgewählt, wo verhältnismäßig viele Stöcke des Krankheitsstadiums 3 vertreten waren. Darunter befanden sich auch einige Todeskandidaten, von denen anzunehmen war, daß sie über Winter eingehen würden. Dieses Mal wurden nur „3"-Stöcke mit Bor gedüngt. Dabei wurde so vorgegangen, daß Borsäure auf einer Kreisfläche von etwa 1 m Durchmesser rings um den Stamm gestreut und

*Tabelle 5*

Zu Versuch 3: Anzahl Stöcke der Krankheitsstadien 0 bis 3 je Zeile, vor und nach Düngung mit Bor

| Zeilenfolge | Stand am 10. 9. 1949 | | | | | | Stand am 27. 9. 1951 | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | jung | Fehlstellen | gesund | Krankheitsstadien 1 | 2 | 3 | jung | Fehlstellen | gesund | Krankheitsstadien 1 | 2 | 3 | |
| 19 | 6 | 2 | — | 2 | 17 | 5 | 4 | 4 | 5 | 13 | 4 | 2 | ohne Bordüngung |
| 20 | 3 | 4 | — | 2 | 15 | 8 | 3 | 4 | — | 18 | 7 | — | |
| 21 | 3 | — | — | 2 | 23 | 4 | 2 | 1 | 1 | 16 | 10 | 2 | |
| 22 | 5 | 2 | — | 4 | 17 | 4 | 5 | 3 | 4 | 11 | 8 | 1 | |
| 23 | 4 | 5 | — | 2 | 18 | 3 | 7 | 2 | 8 | 11 | 4 | — | |
| 24 | 5 | 2 | — | 3 | 10 | 12 | 2 | 6 | 16 | 8 | — | — | mit Bordüngung |
| 25 | 6 | 1 | — | 4 | 13 | 8 | 4 | 4 | 10 | 14 | — | — | |
| 26 | 6 | 1 | 1 | 4 | 9 | 11 | 5 | 2 | 16 | 9 | — | — | |
| 27 | 4 | 1 | — | 7 | 13 | 7 | 5 | 1 | 19 | 7 | — | — | |
| 28 | 3 | — | 3 | 5 | 16 | 5 | 2 | 1 | 26 | 3 | — | — | |
| 29 | 1 | 3 | 2 | 8 | 13 | 5 | 1 | 3 | 22 | 6 | — | — | |
| 30 | 2 | 1 | 1 | 8 | 19 | 1 | 2 | 1 | 13 | 15 | 1 | — | ohne Bordüngung |
| 31 | — | — | 1 | 11 | 15 | 5 | — | 2 | 5 | 21 | 3 | 1 | |
| 32 | 1 | 1 | 1 | 8 | 15 | 6 | — | — | — | 29 | 3 | — | |
| 33 | 2 | 2 | 1 | 4 | 12 | 11 | 1 | 3 | — | 16 | 8 | 4 | |
| 34 | 2 | 2 | — | 4 | 15 | 9 | 1 | 3 | — | 17 | 7 | 4 | |
| 35 | 1 | 1 | — | 4 | 18 | 8 | — | 6 | — | 14 | 10 | 2 | |

anschließend leicht untergehackt wurde. Anlage und Ergebnis des Versuches gehen aus Tabelle 6 hervor. In Zeile 37 erhielten zehn Stöcke je 10 g, in in den Zeilen 38 und 39 19 Stöcke je 20 g und in Zeile 41 15 Stöcke je 5 g Borsäure, und zwar am 12. Juli 1950 sowie die gleiche Gabe am 27. April 1951. Die Bonitierung wurde am 12. Juli 1950 und am 27. September 1951 vorgenommen. Aus der Zusammenstellung in Tabelle 6 ist ersichtlich, daß

*Tabelle 6*

Zu Versuch 4: Wirkung der Bordüngung auf sehr schwer erkrankte Stöcke (Stadium 3)

| Zeilenfolge | Anzahl „3"-Stöcke je Zeile am 12.VII.1950 | Krankheitsstadium derselben Stöcke am 27. IX. 1951 | | | | eingegangene Stöcke | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | gesund | 1 | 2 | 3 | | |
| 33 | 4 | — | — | — | 3 | 1 | |
| 34 | 8 | | — | 4 | 4 | | |
| 35 | 10 | — | 3 | 4 | 2 | 1 | |
| 36 | 9 | — | 5 | 3 | 1 | | |
| 37 | 10 | 8 | 2 | — | — | 20 g | Borsäure je Stock |
| 38 | 19 | 16 | 3 | — | — | 40 g | |
| 39 | | | | | | | |
| 41 | 15 | 7 | 6 | — | — | 2 10 g | |
| 42 | 16 | | 1 | 4 | 7 | 4 | |
| 43 | 12 | — | — | 4 | 8 | | |
| 44 | 8 | — | 1 | 3 | 4 | | |

in Zeile 37 (zweimal 10 g Borsäure) von zehn „3"-Stöcken acht gesund wurden, zwei noch leichte Mangelsymptome zeigten;

in den Zeilen 38 und 39 (zweimal 20 g Borsäure) von 19 „3"-Stöcken 16 gesund wurden und drei noch leichte Mangelsymptome zeigten und

in Zeile 41 (zweimal 5 g Borsäure) von 15 „3"-Stöcken sieben gesund wurden und sechs leichte Mangelsymptome zeigten, während zwei eingingen.

Von den unbehandelten „3"-Stöcken war kein einziger als gesund zu bezeichnen. Hier ist lediglich eine teilweise Besserung eingetreten. Der Versuch läßt den Schluß zu, daß 20 g Borsäure je Stock auf dem Blankenhornsberger Boden ausreichen, um bei sehr schwer kranken Stöcken die Mangelsymptome in relativ kurzer Zeit zum Verschwinden zu bringen. Die doppelte Gabe von 40 g Borsäure je Stock hat nicht geschadet, aber nicht wesentlich mehr geleistet als 20 g. Bei einer Gabe von 10 g Borsäure je Stock ist der Erfolg nicht befriedigend. Die Beobachtungen in diesem Versuch werden fortgeführt. Es soll vor allem festgestellt werden, wie lange die Bordüngung nachhält. Die Gabe von 20 g Borsäure je Stock ist verhältnismäßig hoch. Sie entspricht unter Berücksichtigung der Standweite einer Boraxdüngung von 200 kg/ha, das ist das Zehnfache von dem, was zu Rüben normalerweise angewendet wird.

*Versuch 5*

Blankenhornsberg, Lage Osthang, unter der Gaishalde gelegen. Sorte Silvaner auf Berlandieri × Riparia Kober 5 BB und Teleki 8 B sowie auf Riparia × Rupestris 101[14] veredelt, Pflanzjahr 1928 oder 1929; Drahterziehung, Pflanzweite 1,10 × 0,90 m. Die Anlage diente ursprünglich der Eignungsprüfung der genannten Unterlagen. Der Unterlagen-Versuch läuft quer zur Zeilung. Er stört daher unseren Bordüngungsversuch, der parallel mit der Zeilenrichtung angelegt wurde, nicht. Überdies wurden, soviel wir erfahren und selbst beobachten konnten, keine Wachstumsunterschiede, die mit der Unterlage in Zusammenhang stehen, festgestellt.

Während in den bisherigen Versuchen der Gesundheits- bzw. Krankheitszustand jedes einzelnen Stockes listenmäßig festgehalten wurde, unterblieb hier anfänglich die stockweise Bonitierung. Der Versuch war mehr als eine Art Schaudüngungsversuch gedacht und dementsprechend angelegt worden. Drei unbehandelte Parzellen wechseln mit drei Bordüngungsparzellen ab. Die Bormangelerscheinungen waren auf der gesamten Fläche augenscheinlich ziemlich gleichmäßig vorhanden. Die Zeilen 1 bis 3, 9 bis 13 und 19 bis 23 blieben ohne Bordüngung. Die Zeilen 4 bis 8 und 24 bis 28 erhielten am 15. November 1949 200 g Borsäure je Ar, die Zeilen 14 bis 18 400 g je Ar. Am 27. Juni 1950 wurden auf dieselben Flächen gleichmäßig je 400 g Borsäure pro Ar gestreut. Am 27. April 1951 bekamen die Zeilen 4 bis 8 und 24 bis 28 erneut je 400 g Borsäure pro Ar, und die Zeilen 14 bis 18 600 g Borsäure je Ar.

Insgesamt haben somit die Zeilen 4 bis 8 und 24 bis 28 1 kg und die Zeilen 14 bis 18 1,4 kg Borsäure je Ar erhalten.

Die einzelnen Parzellen zeigten schon im Herbst 1950 augenfällige Wachstumsunterschiede, die im Herbst 1951 noch deutlicher hervortraten. An Stelle einer photographischen Aufnahme, die wohl kaum ein hinreichend deutliches Bild liefern würde, mag Abbildung 17 die Verhältnisse bildhaft wiedergeben. Die Unterlagen sind in Tabelle 7 enthalten. Sie gibt den Stand am 13. September 1951 wieder. Wie bereits gesagt, ist die Ausgangslage im Jahre 1949 nicht festgestellt worden. Am 8. November 1951 zeichneten sich die Bordüngungsparzellen von den unbehandelten von weitem erkennbar besonders dadurch ab, daß in den gedüngten Stücken das Laubwerk noch weitgehend am Stock erhalten war, während die Kontrollparzellen fast völlig entlaubt waren.

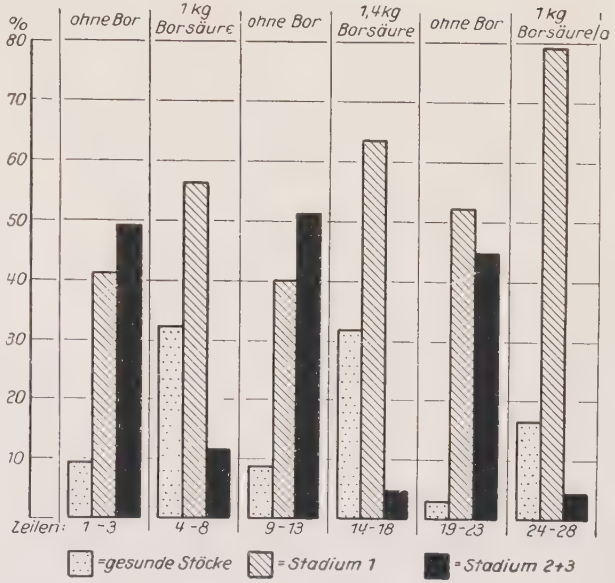



Abb. 17. Zu Versuch 5: Prozentualer Anteil gesunder und kranker Stöcke in Parzellen mit und ohne Bordüngung

*Tabelle 7*

Zu Versuch 5: Anzahl Stöcke der Krankheitsstadien 0 bis 3 in Parzellen mit und ohne Bordüngung

| Zeilen | Borgabe | Anzahl Pflanzstellen | Anzahl vorhandener Stöcke | Anzahl Fehlstellen | | Anzahl gesunder Stöcke | | Anzahl Stöcke in Krankheitsstadium: | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | | 1 | | 2 | | 3 | | 2 und 3 zusammengefaßt in % |
| | | | | absolut | in % der Pflanzstell. | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % | absolut | in % | |
| 1—3 | 0 = Kontrolle .. | 129 | 87 | 42 | 32,5 | 8 | 9,2 | 36 | 41,4 | 31 | 35,6 | 12 | 13,8 | 49,4 |
| 4—8 | 1 kg Borsäure je a .. | 217 | 149 | 68 | 31,3 | 48 | 32,2 | 84 | 56,3 | 11 | 7,4 | 6 | 4,0 | 11,4 |
| 9—13 | 0 = Kontrolle .. | 219 | 125 | 94 | 43 | 11 | 8,8 | 50 | 40,0 | 47 | 37,6 | 17 | 13,6 | 51,2 |
| 14—18 | 1,4 kg Borsäure je a .. | 218 | 169 | 49 | 22,4 | 54 | 31,9 | 107 | 63,4 | 6 | 3,5 | 2 | 1,2 | 4,7 |
| 19—23 | 0 = Kontrolle .. | 220 | 178 | 42 | 19 | 5 | 2,8 | 93 | 52,2 | 69 | 38,7 | 11 | 6,2 | 44,9 |
| 24—28 | 1 kg Borsäure je a .. | 223 | 183 | 40 | 17,9 | 30 | 16,4 | 145 | 79,3 | 7 | 3,8 | 1 | 0,5 | 4,3 |

Den Tabellen ist als Ergebnis zu entnehmen, daß durch die Bordüngung der Prozentsatz der schwerkranken Stöcke stark ab-, der der gesunden zugenommen hat. Wie in Versuch 3 hat die Gabe von 1 kg bzw. 1,4 kg/Ar im Verlauf der zwei Jahre noch nicht zu einer völligen Gesundung ausgereicht. Es ist aber zu bedenken, daß die schweren Krankheitsstadien auch hier sehr stark vertreten waren. Mehr als ein Viertel der Stöcke war trotz wiederholter Nachpflanzung im Laufe der Jahre eingegangen, was sicherlich zum größten Teil auf Konto Bormangel zu buchen ist.

### *Versuch 6*

Blankenhornsberg, Lage Jakobsboden. Sorte Weißer Burgunder auf Berlandieri × Riparia Kober 5 BB und Teleki 8 B veredelt. Pflanzjahr 1933. Drahtanlage.

Für diesen Versuch gilt hinsichtlich der Durchführung dasselbe wie für den vorigen. Am 15. November 1949 wurden die Zeilen 7 bis 13 mit 200 g, die Zeilen 21 bis 27 mit 300 g Borsäure je Ar und am 5. Juli 1950 mit den gleichen Gaben gedüngt. Am 27. April 1951 erhielten die Zeilen 7 bis 13 noch 400 g und die Zeilen 21 bis 27 600 g Borsäure je Ar; insgesamt also die Zeilen 7 bis 13 800 g und die Zeilen 21 bis 27 1,2 kg Borsäure je Ar. Eine Einzelstockbonitierung erfolgte hier nicht. Am 28. September 1951 wurden unter Auslassung der Randzeilen in jeweils vier Zeilen die gesunden und die Stöcke gezählt, die Bormangelsymptome gleich welchen Grades zeigten.

Das Ergebnis ist aus Abbildung 18 ersichtlich. Die Borwirkung zeigt sich auch hier wieder in eindeutiger Weise. Der Versuch ist über das am stärksten rückgängige Teilstück angelegt. Ein Drittel bis über die Hälfte der Stöcke ist in den einzelnen Zeilen bereits eingegangen, und von den vorhandenen sind viele ausgesprochene Kümmerstöcke. Ebenso wie in den Versuchen 3 und 5 konnte hier bei dem weit fortgeschrittenen Stand der Erkrankung mit den angewendeten Gaben keine völlige Gesundung im Laufe der zwei Jahre

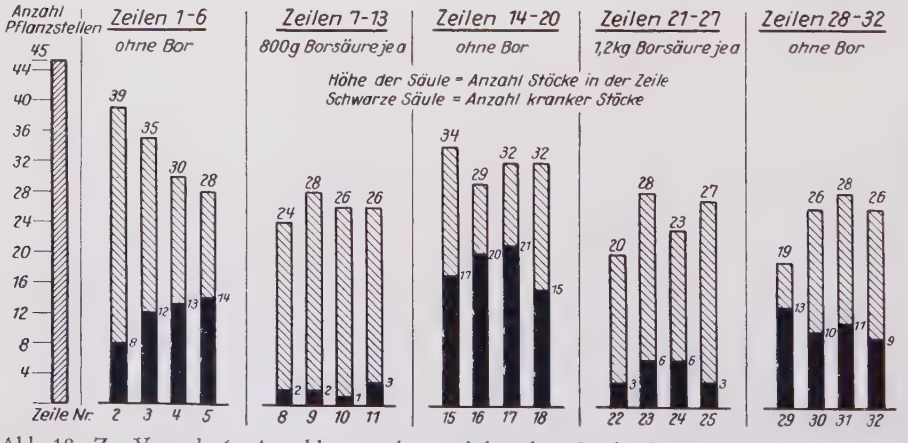



Abb. 18. Zu Versuch 6: Anzahl gesunder und kranker Stöcke in Parzellen mit und ohne Bordüngung

erwartet werden. Der Versuch bedeutet insofern eine Erweiterung der vorigen, als dieses Mal die Sorte Weißer Burgunder im Spiele stand. Wie erwartet verhält sie sich nicht anders als Silvaner.

Weitere Versuche wurden im Frühjahr 1951 in zwei anderen Gemeinden des Kaiserstuhls angelegt, davon einer auf Lößboden. Im letzteren Fall, wo je Stock mit 10 und mit 20 g Borax gedüngt worden war, waren die Mangelsymptome im Herbst 1951 bereits völlig verschwunden. In den zwei anderen Anlagen auf Tephritboden war die Besserung augenfällig. Im Unterschied zu den Blankenhornsberger Beständen handelt es sich hierbei um junge Anlagen, die 1942 und 1945 gepflanzt wurden. Es ist also nicht so, daß sich Bormangelerscheinungen nur in älteren Anlagen zeigen. Schon ein Jahr nach der Pflanzung können junge Reben die schwersten Bormangelsymptome aufweisen, was bei nachgepflanzten Reben in mehreren Fällen beobachtet wurde.

Abschließend kann nach dem Ausfall aller angeführten Versuche gesagt werden, daß die eingangs näher beschriebenen Krankheitserscheinungen die Folge von Bormangel sind.

### 5. Empfindlichkeit verschiedener Rebsorten gegenüber Bormangel

Die Frage, ob die gebräuchlichsten Rebsorten gegenüber Bormangel in verschiedenem Grade empfindlich sind, interessiert aus mehreren Gründen. Sie kann zunächst nur vorläufig und allein auf Grund von Freilandbeobachtungen beantwortet werden. Diesen haftet eine gewisse Unsicherheit insofern an, als auch auf einheitlich erscheinenden Böden Bormangel sehr unregelmäßig verteilt auftritt und Mischsätze, wo mehrere Rebsorten auf kleinem Raum nebeneinander angepflanzt sind, verhältnismäßig selten noch vorhanden sind. Es bot sich aber Gelegenheit, wenigstens in einigen Anlagen Anhaltspunkte über die Sortenempfindlichkeit zu gewinnen. In einer etwa 60 Ar großen Anlage des Blankenhornsberges, in der mehrere Rebsorten durcheinander stehen und sich Bormangel heftig bemerkbar macht, war die Sorte Silvaner am häufigsten und stärksten erkrankt. Die Sorten Müller-Thurgau, Neuburger und Ortlieber zeigten Bormangelsymptome in etwas schwächerem Grade und etwas geringerem Umfang. Weniger als diese waren Ruländer, Gutedel, Blauer Burgunder und Traminer an Bormangel erkrankt. Das schwerste Krankheitsstadium fehlte aber bei keiner der genannten Sorten. In einer anderen jungen Anlage auf tertiärem Lehm (Markgrafschaft), wo einige Sorten nebeneinander gepflanzt sind, leidet die Sorte Silvaner ebenfalls am auffälligsten an Bormangel. Gutedel und Müller-Thurgau sind etwas weniger stark erkrankt. Portugieser zeigt nur schwache Krankheitssymptome. In einem dritten Mischsatz auf Gneisverwitterungsboden (Glottertal) waren nur an der Sorte Silvaner Bormangelsymptome der schwereren Grade zu sehen; die Hauptsorten des Bestandes, Blauer Burgunder, Ruländer, Traminer, Portugieser, Muskateller zeigten nur vereinzelt die schwächsten Anzeichen von Bormangel. — Was die sortenreinen Bestände anbelangt, in denen uns

Bormangelerscheinungen begegneten, so war immer die Sorte Silvaner am stärksten erkrankt. In einem Fall (Blankenhornsberg) leidet auch Weißer Burgunder besonders schwer.

Alle bisherigen Erfahrungen deuten darauf hin, daß die Sorte Silvaner am stärksten auf Bormangel reagiert. Nicht viel weniger empfindlich scheinen Müller-Thurgau, Neuburger und Ortlieber zu sein. Über die Einreihung der anderen Sorten läßt sich vorerst nichts Sicheres sagen. Ob die Weiße Burgunderrebe neben Silvaner zu stellen ist, läßt sich auf Grund des einen Falles nicht sicher sagen, zumal die nächsten Verwandten dieser Sorte, Blauer Burgunder und Ruländer, sicher weniger empfindlich als Silvaner sind.

Über die spezifische Funktion des Elementes Bor im Leben der Pflanze ist noch nichts Sicheres bekannt. Ebensowenig weiß man, warum die eine Pflanzenart oder -sorte mehr Bor braucht als eine andere. Wenn unter gleichen Verhältnissen im einen Fall eher Bormangelsymptome auftreten als im anderen, so kann dies daran liegen, daß das Aneignungsvermögen für Bor verschieden groß ist. Bei der Rebe scheint jedoch das Aneignungsvermögen der Wurzeln nicht ausschlaggebend für das sortentypische Verhalten gegenüber Bormangel zu sein; denn in den von uns beobachteten Fällen handelt es sich hauptsächlich um veredelte Reben, und die Wurzeln gehören meistens ein und derselben Unterlage, nämlich Berlandieri × Riparia-Typen, an. Würde das Aneignungsvermögen der Wurzeln maßgeblich sein, dann müßte dieses von dem Edelreis irgendwie spezifisch gesteuert werden. Größere Wahrscheinlichkeit hat die Annahme für sich, daß der Borbedarf an sich bei den einzelnen Edelsorten verschieden groß ist. — Es wird eine der nächsten Aufgaben sein, in exakten Versuchen die Ansprüche der wichtigsten Edel- und Unterlagssorten an die Borversorgung festzustellen.

### 6. Auftreten von Bormangelerscheinungen an Reben auf verschiedenen Böden

Nähere Angaben über die flächenmäßige Verbreitung des Bormangels in den Rebanlagen Badens können vorerst noch nicht gemacht werden. Dazu war die Zeit, seit das Krankheitsbild der Rebe bei Bormangel mit Sicherheit bekannt ist, noch zu kurz. Im Rahmen dieser Veröffentlichung dürfte mehr die Frage interessieren, auf welchen Bodenarten mit dem Vorkommen von Bormangelerscheinungen an der Rebe zu rechnen ist. Nach den bisherigen Beobachtungen, die nicht systematisch durchgeführt werden konnten, sondern bei mehr gelegentlichen Rebenbegehungen innerhalb unseres Dienstbezirkes gemacht wurden, kommt Bormangel auf fast allen Bodenarten — herkunftsmäßig gesehen —, wo in Baden Reben angepflanzt sind, vor. Bis jetzt trafen wir bormangelkranke Reben an: im Bodenseegebiet auf Molasse und Moränenschutt, in der Markgrafschaft auf tertiärem Lehm und auf Muschelkalk, am Kaiserstuhl auf Tephrit und Löß, im Glottertal auf Gneisverwitterung, im Breisgau auf Muschelkalk, in Mittelbaden auf Granitverwitterung und im Taubergrund auf Muschelkalk.

In einer vorläufigen Mitteilung (Wilhelm 1950) wurde bereits die Vermutung geäußert, daß die von Röder (1934) beschriebene Erkrankung in Schieferböden an der Mosel auf Bormangel zurückzuführen ist. Die Berechtigung dazu gab das Krankheitsbild, das in allen wesentlichen Zügen für Bormangel charakteristisch ist. Heute kann die damalige Vermutung noch durch die kürzlich gemachte Beobachtung gestützt werden, wonach auf den Tonschieferböden der Mosel Bormangel tatsächlich in Erscheinung tritt. Bei einem nur einige Kilometer weiten Gang durch Rebgelände bei Bernkastel Mitte Oktober dieses Jahres, sind mir mehrere am Weg stehende Rieslingstöcke aufgefallen, die Bormangelsymptome schweren Grades aufwiesen.

Wenn die bisherigen Feststellungen über das Vorkommen von Bormangel auf verschiedenen Bodenarten auch erst auf verhältnismäßig engem Raum und selbst hier nicht in wünschenswertem Umfang gemacht werden konnten, so sind sie doch aufschlußreich. Die Böden, auf denen Bormangel angetroffen wurde, gehören nämlich ihrer Entstehung und Zusammensetzung nach weitverbreiteten Hauptgruppen an. Man kann daraus schließen, daß mit dem Vorkommen von Bormangel auf den meisten Bodenarten, auf denen Reben angebaut werden, zu rechnen ist, um so mehr als Weinbau im allgemeinen auf warmen und trockenen Böden und in nicht sehr niederschlagsreichen Gebieten betrieben wird und Trockenheit bekanntlich das Auftreten von Bormangelerscheinungen im hohen Maße begünstigt.

## 7. Die Wirkung von Borüberdüngung auf die Rebe

Bor wird bekanntlich zu einem starken Pflanzengift, wenn es in höheren Konzentrationen zur Einwirkung gelangt. Bei der Düngung damit ist deshalb einige Vorsicht geboten. Aus diesem Grunde wurden anfangs bei unseren Versuchen, die in fremden Anlagen durchgeführt wurden, verhältnismäßig schwache Gaben angewendet. Da immerhin damit zu rechnen ist, daß in der Praxis durch Überdüngung mit Bor Schäden an Reben entstehen können, war es wünschenswert zu wissen, wie Schädigungen an der Rebe durch Bor aussehen, um sie gegebenenfalls sicher diagnostizieren zu können. Ferner interessierte die Frage, wie gleiche Mengen Bor auf verschiedenen Böden wirken und ob sich Unterschiede im Festlegungsvermögen von Bor in einfacher Weise feststellen lassen. Unter diesen Gesichtspunkten wurden die nachstehenden Versuche angelegt:

### *Versuch a*

Im Gewächshaus herangezogene Rieslingreben, vorjährige Stupfer, wurden am 2. Juni 1951 in gewöhnliche Blumentöpfe, 16 cm Durchmesser, umgepflanzt. Dazu wurden folgende Böden verwendet:

I. Gartenerde = humoser, lehmiger Sand.
II. Tephritverwitterungsboden vom Blankenhornsberg = stark alkalischer, sandiger Lehm.
III. Löß vom Kaiserstuhl.
IV. Künstliches Sand-Torf-Gemisch (= 4 Vol. Grubensand, 1 Vol. Torf).

Am 9. Juni erhielten jeweils drei Gefäße durch langsames Obenaufgießen je 100 ccm nachstehender Lösungen: 1. Borsäure 0,3 %, 2. Borsäure 0,2 %, 3. Borsäure 0,1 %, 4. Borax 0,45 %, 5. Borax 0,3 %, 6. Borax 0,15 %, 7. Wasser = Kontrolle. Die Reben verblieben im Gewächshaus und wurden wie üblich mit Wasser versorgt. Die ersten Schädigungen zeigten sich am 25. Juni. Am 23. Juli wurde der Versuch abgebrochen und die Schädigungen nach folgender Skala bewertet:

1. Leichteste Schädigung: Blätter am Rand nach oben oder unten eingewölbt und der Rand gewöhnlich etwas aufgehellt, blaßgrün. Blattzähne großenteils leicht gebräunt (Abb. 19).
2. Leichte Schädigung: Außer den genannten Symptomen punktförmige Bräunungen in der Blattrandzone (Abb. 20).
3. Schwere Schädigung: Wie bei 2, punktförmige Nekrosen auch in den Interkostalfeldern.
4. Sehr schwere Schädigung: Nekrosen nicht mehr punktförmig getrennt, sondern zusammenfließend. Blätter vertrocknen später (Abb. 21).

Das Ergebnis ist in Tabelle 8 zusammengefaßt.

*Tabelle 8*

| Borgabe | I Gartenerde | II Tephritboden | III Löß | IV Sand-Torf-Mischung |
|---|---|---|---|---|
| Borsäure 0,3 g | 2×1, 1×0 | 3×1 | 3×4 | 1×3, 1×2, 1×1 |
| Borsäure 0,2 g | 3×1 | 1×1, 2×0 | 2×4, 1×2 | 1×2, 2×1 |
| Borsäure 0,1 g | 3×0 | 3×0 | 2×2, 1×1 | 3×1 |
| Borax 0,45 g | 1×3, 2×1 | 1×1, 2×0 | 1×3, 2×1 | 2×4, 1×2 |
| Borax 0,3 g | 3×2 | 1×1, 2×0 | 1×4, 1×3, 1×2 | 1×4, 2×2 |
| Borax 0,15 g | 3×1 | 1×1, 2×0 | 1×2. 2×1 | 3×1 |
| Wasser = Kontrolle | 3×0 | 3×0 | 2×0 | 3×0 |

Dem Versuch ist zu entnehmen, daß gleiche Bormengen auf Tephritboden am wenigsten schädlich werden. Die größten Schädigungen stellen sich bei Löß und Sand-Torf ein. In Gartenerde scheint Borax giftiger als Borsäure zu sein. Der gleiche Unterschied ist bei Sand-Torf angedeutet.

*Versuch b*

Die Anlage dieses Versuches ist grundsätzlich dieselbe wie bei dem vorigen. Mit den Borgaben wurde etwas heruntergegangen und eine andere Rebsorte, Gutedel, verwendet. Da die Reben im Wachstum bereits nach-

Abb. 19. Jüngere Rieslingblätter; geschädigt durch Überdüngung mit Bor: anomale Blattform, stark gewölbt, Aufhellung und Nekrosen am Rand
*Bild: 25. 7. 1951*

Oben rechts:
Abb. 20. Rieslingblatt; punktförmige Nekrosen durch Überdüngung mit Bor
*Bild: 25. 7. 1951*

Abb. 21. Rieslingrebe, durch Überdüngung mit Bor stark geschädigt; Blattränder verdorrt, interkostal zusammenfließende Nekrosen
*Bild: 25. 7. 1951*

ließen, wurden sie am 10. Juli 1951 bis auf fünf Blätter zurückgeschnitten und nach dem Umpflanzen leicht mit Nitrophoskalösung gedüngt. Etwa vier Wochen später, nachdem neue Triebe gebildet waren, wurden am 6. August je 100 ccm Borlösung zugegeben. Am 19. September ergab sich das in Tabelle 9 summarisch festgehaltene Bild.

*Tabelle 9*

| Borgabe | I Gartenerde | II Tephritboden | III Löß | IV Sand-Torf-Mischung |
|---|---|---|---|---|
| Borsäure 0,2 g | 3×0 | 3×0 | 3×4 | 3×4 |
| Borsäure 0,1 g | 3×0 | 3×0 | 3×0 | 2×3, 1×0 |
| Borsäure 0,05 g | 3×0 | 3×0 | 3×0 | 3×0 |
| Borax 0,3 g | 1×2, 2×0 | 3×0 | 3×4 | 3×4 |
| Borax 0,075 g | 3×0 | 3×0 | 3×0 | 1×2, 2×0 |
| Borax 0,15 g | 3×0 | 3×0 | 3×0 | 1×1, 2×0 |
| Wasser = Kontrolle | 3×0 | 3×0 | 3×0 | 3×0 |

Das Schadensbild war bei Gutedel das gleiche wie bei Riesling. Es darf demnach als typisch für Schädigungen der Rebe durch zu hohe Borgaben angesehen werden. Auf Tephritboden war dieses Mal keine Schädigung festzustellen, während bei Löß und Sand-Torf wieder starke Schädigungen eintraten. Beide Versuche stimmen somit dahingehend überein, daß dieselben Borgaben, die auf Tephritboden unschädlich sind, auf Löß- und Sandboden zu schweren Schädigungen der Reben führen können. Höchstwahrscheinlich hat Tephritboden eine großes Festlegungsvermögen für Bor. Für die Praxis der Bordüngung ergibt sich hieraus der Hinweis, daß auf Löß- und Sandböden, vermutlich auf leichteren Böden überhaupt, Bormangel mit viel schwächeren Gaben behoben werden kann als auf Tephritboden. Damit steht im Einklang, daß in dem erwähnten Versuch auf Lößboden 10 g Borax je Stock bereits ausgereicht haben, um die Bormangelsymptome zum Verschwinden zu bringen, während mit denselben Gaben auf Tephritböden lediglich eine Besserung erzielt wurde. — Was die Beweglichkeit und Festlegung von Bor auf verschiedenen Bodenarten betrifft, so konnten die oben mitgeteilten Versuche ihrer ganzen Anlage nach nur einer ersten Orientierung dienen. Um einwandfreie Unterlagen in dieser Beziehung zu erhalten, sind Versuche mit anderer Methodik unter Einbeziehung der hauptsächlichen Bodentypen, auf denen bei uns Weinbau betrieben wird, vorgesehen.

## 8. Schrifttum über Bor und Rebe

Bereits in den 90er Jahren des vorigen Jahrhunderts wurde festgestellt, daß in Reborganen und Wein regelmäßig Bor vorhanden ist (K. Scharrer 1941). Traubenweine erwiesen sich unter den aus Pflanzen hergestellten Flüssigkeiten als am reichsten an Bor. Seit vor rund 20 Jahren der Nachweis geführt wurde, daß Bor für Pflanzen ein lebensnotwendiges Element dar-

stellt und daß Bormangel unter natürlichen Verhältnissen zu schweren Ernteeinbußen bei wirtschaftlich wichtigen Kulturpflanzen führt, sind etwa 2000 Veröffentlichungen erschienen, die sich mit dem Borbedarf und -gehalt zahlreicher Pflanzenarten, dem Vorkommen und Verhalten von Bor im Boden und ähnlichen Fragen befassen (K. C. Berger 1949). Nach einer kürzlich erschienenen Zusammenstellung ist die Unentbehrlichkeit von Bor für 156 Pflanzenarten festgestellt worden (Schropp 1950). Für die Rebe hat diesen Nachweis W. Maier (1937) an Wasserkulturen mit Rebsämlingen geliefert. Sämlinge der Sorte Riesling zeigten bei Anzucht in Nährlösung nach von der Krone ohne Borzugabe tiefgreifende Veränderungen. Die Blätter färbten sich hellgrün und schließlich gelb. Der Vegetationspunkt der Sproßachse starb frühzeitig ab. Die Internodien blieben kürzer und die Blätter wesentlich kleiner als bei Borzusatz. Außerdem machte sich eine Neigung zur Bildung von Seitensprossen bemerkbar. Wie sich Bormangel im Weinberg äußert und ob er überhaupt bei der Rebe unter natürlichen Verhältnissen eine Rolle spielt, war in der alten Welt bis vor kurzem noch unbekannt (Wilhelm 1950). Nachdem bereits die weiter vorn mitgeteilten Versuche eindeutige Resultate erbracht hatten, konnten einige überseeische Veröffentlichungen[3]) eingesehen werden, die sich mit Bormangelerscheinungen an Reben unter natürlichen Verhältnissen befassen.

Über einen Fall, wo auf einem schweren Lehmboden (clay-loam type of soil) in Neuseeland die Sorte Albany Surprise unter Bor- und gleichzeitig unter Kalimangel litt, berichtet H. O. Askew (1944). Der Bormangel äußerte sich in einer braungrünen Verfärbung von Gewebepartien unter der Haut noch unreifer Beeren. Später bräunten sich die verfärbten Beerenfleischteile und starben ab. Das Krankheitsbild glich weitgehend der Innenkorkbildung der Äpfel, die auf jenem Boden ebenfalls an Bormangel erkrankten. Das vegetative Wachstum der Reben war nicht beeinträchtigt. Auch Blattsymptome, die mit Bormangel in Verbindung gebracht werden könnten, zeigten sich nicht. Durch Düngung mit Borax (rund 32 kg/ha) ließ sich die Bormangelerscheinung beheben. — Ebenfalls nur an den Trauben machte sich Bormangel in Australien auf einem Boden granitischer Herkunft bemerkbar. Nach F. A. L. Jardine (1946) ist dort eine Erscheinung weit verbreitet, die als „hen and chickens" bezeichnet wird und den Marktwert von Tafeltrauben mindert. Die Mehrzahl der Beeren wird weniger als halb so groß wie normal (chickens) und nur wenige Beeren erreichen volle Größe (hen). Sonstige Wachstumsstörungen oder Blattsymptome traten nicht auf. Zur Verhütung der Kleinbeerigkeit wird Düngung mit Borax (28 bis 56 g pro Stock, je nach Alter) oder Spritzen mit Boraxlösung (453 g auf 90 l Wasser) drei Wochen vor der Blüte empfohlen. — Weitergehende Krankheitssymptome als in den eben erwähnten Fällen hat L. E. Scott (1944) als Folge von Bormangel auf einem Versuchsfeld (Boden: Norfolk Sand) in Südkarolina beobachtet. An den Blättern zeigten sich chlorotische Flecken am Rand und zwischen den Nerven, selten aber Ab-

[3]) Herrn Dr. F. Borchers, Goslar, bin ich zu großem Dank für die Beschaffung der ausländischen Literatur verpflichtet. Vor kurzem wurde darüber an anderer Stelle referiert (Wilhelm 1951).

sterbeerscheinungen und kein vorzeitiger Blattfall. Die Blätter waren außerdem oft schmal und mißgestaltet, hatten eine rauhe Oberfläche und wölbten den Rand nach unten. Nach dem Vegetationsbeginn machte sich eine Wachstumsstockung der Triebe und die Tendenz zur Bildung mehrerer Seitensprosse an einem Knoten bemerkbar. Die Internodien blieben kurz. Absterben der Vegetationspunkte wurde nicht beobachtet. Die Gescheine waren mißgestaltet und der Beerenansatz fehlte. Das Versuchsfeld diente der Sortenprüfung, wozu 50 verschiedene Sorten blockweise zu fünf oder zehn Stöcken angepflanzt waren, und bot daher gute Gelegenheit zu Beobachtungen über das sortentypische Verhalten gegenüber Bormangel. Ein Teil der Sorten zeigte extrem ausgebildete Blattsymptome und Wachstumsstockungen und blieb ertragslos. Andere Sorten wiesen nur schwache Laubsymptome auf. Der Ertrag war mehr oder weniger stark beeinträchtigt. Eine dritte Gruppe reagierte nur mit schwachen Laubsymptomen. Ein Einfluß auf den Ertrag war nicht mit Sicherheit festzustellen. — Düngung mit Borax (4,5 kg auf 0,4 ha) hatte auf den Ertrag eine auffallendere Wirkung als auf das vegetative Wachstum. Die Erträge waren auch bei einigen Sorten, wovon die unbehandelten Kontrollstöcke keine Bormangelsymptome an den Blättern aufwiesen, stark gesteigert. Bestimmungen des Borgehaltes ergaben auffallend große Unterschiede in den Blättern: Er betrug im niedrigsten Falle 7,4 ‰, im höchsten 106,8 ‰. Der Gehalt zeigte sich abhängig von der Rebsorte, dem Zeitpunkt der Probenahme und von der Bordüngung. Der Borspiegel war im ersten Wachstumsabschnitt am niedrigsten. Zwischen der Anfälligkeit der einzelnen Sorten gegenüber Bormangel und ihrem Borgehalt war keine strenge Beziehung vorhanden. Scott vermutet zwischen Borversorgung und Fruchtansatz einen engen Zusammenhang. Bei dieser Gelegenheit wird auf eine japanische Veröffentlichung von Oinoue (1938) verwiesen, wonach der Fruchtansatz der Sorte Muskat von Alexandrien durch Spritzen mit Borlösung bedeutend erhöht wurde. Die genannte Rebsorte leidet allgemein unter „millerandage“ (= Kleinbeerigkeit oder Verrieseln?), was durch allgemeine Düngungs- und andere Maßnahmen nicht behoben werden konnte. Scott erwähnt ferner, daß Snyder und Harmon (1942) bei der gleichen Sorte durch Zinkbehandlung eine merkliche Besserung des Fruchtansatzes erreicht haben. Das für Zinkmangel charakteristische Merkmal littleleaf war jedoch nicht vorhanden. Außerdem enthält das handelsübliche Zinksulfat 15 ‰ Bor. Die Annahme hat daher viel für sich, daß in Bor der wirksame Faktor der Zinkbehandlung zu sehen ist.

## 9. Schlußbetrachtung

Die soeben erwähnten Veröffentlichungen zeigen, daß Bormangel bei Reben auch in überseeischen Ländern vorkommt. In Australien wurde er auf einem Boden granitischer Herkunft, in Neuseeland auf schwerem Lehmboden (clay-loam type of soil) und in Amerika auf einem Sandboden festgestellt. Durch das Hinzukommen eines Sandbodens ist die Liste der Bodentypen, auf denen Bormangel beobachtet wurde, bereits groß genug, um mit ziemlicher

Sicherheit sagen zu können, daß mit dem Auftreten von Bormangel wohl auf allen Bodentypen, wo Weinbau getrieben wird, zu rechnen ist[4]).

Was die Krankheitssymptome betrifft, so stimmen die in Amerika gemachten Beobachtungen mit den eigenen weitgehend überein, wiewohl es sich dort um ganz andere Rebsorten und Bodenarten als bei uns handelt. Ein besonderer Fall scheint das Auftreten einer Art Internal cork an Trauben in Neuseeland zu sein, was bisher von keiner anderen Seite beobachtet wurde. Möglicherweise liegt hier eine Sorteneigentümlichkeit der Reaktion auf Bormangel vor. Besondere Beachtung verdienen die in Amerika, Australien und Japan an verschiedenen Rebsorten gemachten Erfahrungen, wonach bei Bormangel der Fruchtansatz und die Ausbildung der Beeren leiden, o h n e d a ß s i c h g l e i c h z e i t i g n o c h a n d e r e M a n g e l s y m p t o m e b e m e r k b a r m a c h e n. Bevor uns diese Befunde bekannt waren, wurde in unserer vorläufigen Mitteilung schon die Vermutung ausgesprochen, daß das im europäischen Weinbau häufig vorkommende Verrieseln — jedenfalls in manchen Fällen — durch Bormangel verursacht sein kann; denn Absterben und Verrieseln der Gescheine gehören, wie bei der Darstellung des Krankheitsbildes schon gesagt ist, zu den Hauptkennzeichen des Bormangels an Reben. Unter Verrieseln versteht der Winzer, daß sich nur ein Teil der Blüten weiterentwickelt, während der andere abfällt. Stirbt der ganze Blütenstand meistens schon vor der Blüte unter Braunwerden und Vertrocknen ab, dann spricht der Praktiker von „Abwachsen" oder „Durchfallen" der Gescheine. Als Ursachen für Durchrieseln und Abwachsen werden gewöhnlich Unterernährung, Temperaturen unter 15 ° kurz vor oder während der Blüte oder zu starkes Triebwachstum angegeben. Sehr große praktische Bedeutung hat das Durchrieseln, wenn Edelsorten auf starkwüchsige Unterlagen, vor allem auf den viel benützten Berlandieri × Riparia — Kreuzungen veredelt sind. Als Gegenmaßnahmen werden außer starkem Anschneiden und größerer Standweite vor allem Verzicht auf Stickstoffdüngung bis zum Nachlassen des übermäßigen Triebwachstums und scharfer Rückschnitt, d. h. Einkürzen der Triebe bis auf drei bis vier Blätter oberhalb der Gescheine kurz vor der Blüte empfohlen. Der Erfolg ist jedoch meistens recht unsicher. In Praktikerkreisen erklärt man sich den Zusammenhang so, daß die Blütenansätze aus Mangel an Nährstoffen, die vor allem von der stark wachsenden Triebspitze in Anspruch genommen werden, absterben oder in der Entwicklung mehr oder weniger stark gehemmt, also regelrecht verhungern würden. Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, daß in einem Mangel an Kernnährstoffen, an Kohlenhydraten oder Eiweißverbindungen, d. h. an Stoffen, die in verhältnismäßig großen Mengen zum Organaufbau und zum Betriebsstoffwechsel benötigt werden, die Ursache des unbefriedigenden Ansatzes zu suchen ist. Mehr hat die Annahme für sich, daß ein an den Reproduktionsprozessen spezifisch beteiligter Stoff im Zeitpunkt des größten Bedarfes in ungenügender Menge vorhanden ist. Dafür, daß es sich hierbei um Bor handeln kann, sprechen

[4]) Auf meine vorläufige Veröffentlichung hin (Wilhelm 1950) sind mir inzwischen aus Südtirol, Steiermark und Niederösterreich briefliche Mitteilungen zugegangen, welche für diese Länder das Auftreten von Bormangelerscheinungen bestätigen.

außer der Tatsache, daß bei Bormangel die Fruchtbildung der Rebe am meisten in Mitleidenschaft gezogen ist, bei vielen anderen Pflanzenarten gemachte Erfahrungen, so die Unentbehrlichkeit von Bor für die Pollenkeimung von Nimphaea-Arten (Schmucker 1933), die Erhöhung der Keimungsrate und die bessere Entwicklung des Pollens in Gegenwart von Bor bei einer Reihe von Pflanzen (Bobko und Zerling 1938), die Taubblütigkeit normal entwickelter Senf- und Rapspflanzen bei Bormangel (Hasler und Maurizio 1949), der geringe Samenansatz bormangelkranker Kohlrabipflanzen (Brandenburg 1949). — Unter dem erwähnten Gesichtspunkt dieses Frühjahr eingeleitete Versuche lassen noch kein Urteil zu. Die Bordüngung wurde erst im April ausgebracht, was auf den dazu benützten schweren Böden vermutlich zu spät war. Die Versuche in dieser Richtung werden fortgeführt.

Bei unseren vorn mitgeteilten Düngungsversuchen könnten Ertragsfeststellungen vermißt werden. Man muß jedoch berücksichtigen, daß es seinerzeit in erster Linie um die Feststellung ging, ob bestimmte Krankheitserscheinungen, deren Ursache unbekannt war, die Folge von Bormangel sind. Da augenscheinlich bormangelkranke Reben ohnehin keinen oder einen offensichtlich nur ganz geringen Ertrag bringen, waren Ertragsbestimmungen zunächst überflüssig. Nunmehr treten andere Fragen in den Vordergrund. Vor allem wird zu untersuchen sein, mit welchen Bormengen der Mindestbedarf der Rebe gedeckt wird und wann von optimaler Borversorgung gesprochen werden kann. Wir haben bei unseren bisherigen Versuchen den Eindruck gewonnen, daß Bordüngung nicht nur den Ertrag gesteigert, sondern auch das vegetative Wachstum gefördert hat, ohne daß äußere Mangelsymptome zu sehen waren. In diese Richtung weist auch eine vor Jahren bei Gefäßversuchen gemachte Beobachtung, wonach einjährige, aus Stecklingen gezogene Silvanerreben in einem Boden mit hohem Kalkgehalt bei Borzugabe ein auffallend besseres Wachstum zeigten als in den Reihen, wo zu dem nämlichen Boden kein Bor zusätzlich gegeben worden war[5]).

Im europäischen Weinbau weitverbreitete Rückgangserscheinungen werden als Folge der sogenannten Reisigkrankheit (Arriciamento in Italien, Krautern in Österreich, court-noué in Frankreich) angesprochen. In seiner ausgeprägten Form hat das Krankheitsbild der Rebe bei Bormangel wesentliche Züge mit dem der Reisigkrankheit gemeinsam: Schwacher Wuchs, Durchrieseln, kurze Internodien, häufige Doppelaugen, vorzeitiges Austreiben der Geiztriebe. Pantanelli und Schneiders (1934) fanden an den Blättern reisigkranker Stöcke auch eine Mosaikfleckung, allerdings als eine verhältnismäßig seltene Erscheinung. „Hierbei war nicht immer zu entscheiden, ob diese Bilder nicht zum Teil durch Stichstellen saugender Insekten verursacht waren." (Schneiders S. 24.) Eine mosaikartige Aufhellung ist nun auch ein Blattsymptom bei Bormangel. Bezeichnenderweise wurde diese Mosaikfleckung uns gegenüber von mehreren Seiten als Stütze für die Meinung angeführt, daß

[5]) Der in Rede stehende Versuch ist vor nunmehr zwölf Jahren im Rahmen von Untersuchungen über die sogenannte Kalkchlorose der Rebe angelegt worden. Die Aufzeichnungen darüber sind mit der Zerstörung des Instituts während des Krieges verlorengegangen.

die Rückgangserscheinungen, die sich später als Folge von Bormangel erwiesen, auf Befall durch Kräuselmilbe zurückzuführen seien. Obwohl sich das für die Reisigkrankheit als spezifisch angesehene Kennzeichen, die intrazellulären Zellstäbe *(cordoni endocellulari)*, in den daraufhin stichprobenweise untersuchten bormangelkranken Reben nicht oder jedenfalls nur vereinzelt nachweisen ließ, wird man zu prüfen haben, ob in manchen Fällen nicht mehr als nur eine Ähnlichkeit zweier Krankheitsbilder vorliegt, um so mehr, als über die Ursache der sogenannten Reisigkrankheit lediglich Vermutungen bestehen, Zellstäbe auch in gesunden Reben und anderen Pflanzen vorkommen und Zellstabbildung zum Beispiel durch Kältebehandlung künstlich ausgelöst werden kann.

Über die Höhe der Borgaben, die in der Praxis anzuwenden sind, lassen sich vorerst nur grobe Angaben machen. Die Mengen, welche die weiter vorn zitierten ausländischen Autoren nennen, bewegen sich in recht weiten Grenzen. Bei Scott haben 110 g Borax je Ar bereits ausgereicht, um die Bormangelsymptome, offensichtlich leichterer Natur, auf einem Sandboden zum Verschwinden zu bringen. Jardine dagegen gibt 28 bis 56 g je Stock an. Solange noch keine einfachen und sicheren Methoden bekannt sind, womit die Borbedürftigkeit eines Bodens festgestellt werden kann, wird man sich am besten an mittlere Gaben halten. Unsere bisherigen Erfahrungen gehen dahin, daß auf schweren und kalkreichen Böden 2 kg Borax je Ar, auf leichteren 1 kg je Ar zur Behebung offensichtlicher Bormangelschäden an Reben zu empfehlen sind. Wie lange diese Gaben anhalten, muß sich in den nächsten Jahren zeigen. Wo keine Mangelsymptome zu sehen sind, wird einer allgemeinen Anwendung von Bordüngern in Weinbergen vorerst nicht das Wort geredet. Es ist aber zu begrüßen, wenn an möglichst vielen Stellen versuchsweise mit Bor gedüngt und festgestellt wird, ob Wachstum und Ertrag darauf ansprechen. Ob man Borsäure, Borax am besten in Grießform, Borschlamm, einen borhaltigen Mischdünger, z. B. Bor-Superphosphat oder Stadtmüll, der bekanntlich reich an Bor ist, verwendet, dürfte keinen Unterschied ausmachen. Über den Zeitpunkt der Bordüngung läßt sich bis jetzt so viel sagen, daß Bor bereits zu Beginn der Vegetationszeit den Wurzeln zur Verfügung stehen muß. Der größte Borbedarf besteht offensichtlich vor und während der Blütezeit. Auf schwereren Böden wird Bor am zweckmäßigsten noch vor Winter ausgebracht. Wegen der möglichen Festlegung von Borsalzen durch Kalk wird man es vermeiden, Bor zusammen mit branntkalkhaltigen Düngemitteln auszustreuen.

## 10. Zusammenfassung

1. Durch mehrjährige Versuche wird nachgewiesen, daß schwere Rückgangserscheinungen, die sich in Rebanlagen Badens, vor allem des Kaiserstuhls zeigten, auf Bormangel zurückzuführen sind.
2. Das Krankheitsbild der Rebe, das sich unter natürlichen Verhältnissen bei Bormangel ergibt, wird geschildert. Es weist folgende Hauptzüge auf: Nachlassen im Wachstum bis zum Auftreten ausgesprochener Küm-

merformen, schwaches, enggliedriges Holz, Doppelaugen, Absterben der Vegetationspunkte, verstärkte Bildung von Geiztrieben, völliges oder teilweises Abwachsen und Durchrieseln der Gescheine, am Laub mosaikartige Fleckung, Ausbleichen der Blattrandpartien und der Interkostalfelder, vielfach Nekrosen.

3. Hinsichtlich der Empfindlichkeit der wichtigsten Rebsorten gegenüber Bormangel wurde vorläufig gefunden, daß sie bei Silvaner am größten ist. Dieser Sorte zunächst sind Müller-Thurgau und Neuburger einzureihen. Vermutlich gehört auch Weißer Burgunder zu der ersten Gruppe. Weniger häufig und schwer machte sich in Baden Bormangel bei Riesling, Traminer, Ruländer, Blauem Burgunder, Gutedel, Muskateller, Portugieser und Ortlieber bemerkbar.
4. Erhebungen zur Frage, auf welchen Bodentypen mit Bormangel an Reben zu rechnen ist, ergaben, daß sich in Baden Bormangelerscheinungen auf Molasse, Moränenschutt, tertiärem Lehm, Muschelkalk, Vulkanverwitterungs(Tephrit-), Gneis-, Granitverwitterungsboden und Löß zeigen. Auch auf Tonschieferboden der Mosel wurde Bormangel angetroffen.
5. In Gefäßversuchen, wobei gleichgroße Bormengen zu verschiedenen Bodenarten gegeben wurden, wurde festgestellt, daß Tephritboden ein viel größeres Festlegungsvermögen für Bor aufweist als Lößboden, humoser Sand oder Sand-Torf-Mischung. Die durch Überdüngung mit Bor hervorgerufenen Schädigungen an Reben wurden zu diagnostischen Zwecken beschrieben.
6. Nach neueren ausländischen Veröffentlichungen über Bormangelerscheinungen an Reben stimmen die besonders in Amerika an anderen Rebsorten als bei uns gemachten Erfahrungen mit den eigenen weitgehend überein.
7. Es werden Gründe für die Vermutung angeführt, daß Abwachsen und Durchrieseln der Gescheine vielfach auf ungenügende Borversorgung zurückzuführen sind, auch wenn sich keine sonstigen Mangelsymptome zeigen. Ferner wird darauf hingewiesen, daß die ursächlich noch ungeklärte sogenannte Reisigkrankheit im äußeren Erscheinungsbild viel Ähnlichkeit mit Bormangelerscheinungen hat und daß daher eine Überprüfung reisigkranker Anlagen unter dem Gesichtspunkt von Bormangel angezeigt erscheint.
8. Zum Schluß werden Anweisungen für die Bordüngung in der Weinbaupraxis gegeben.

## Literaturverzeichnis

1. Askew, H. C., A case of combined Potassium and Boron Deficiencies in Grapes. New Zealand Journal of Science and Technology. **26**, 146—152, 1944.
2. Berger, K. C., Boron in Soil and Crops. Advances in Agronomy Vol. I. 1949. Academic Press inc. New York.
3. Bobko, E. V. und Zerling, V. V., Der Einfluß des Bors auf die reproduktive Entwicklung der Pflanzen. Bot. Z. **23**, 3—11, 1938.

4. Brandenburg, E., Wo stehen wir heute in der Borfrage? Zeitschr. f. Pflanzenkr. und Pflanzenschutz **56**, 241—251, 1949.

5. Hasler, A. und Maurizio, A., Die Wirkung von Bor auf Samenansatz und Nektarsekretion bei Raps. *(Brassica Napus L.)* Phytopatholog. Zeitschr. **15**, 193—207, 1949.

6. Jardine, F. A. L., The Use of Borax on Waltham Cross Grapes in the Stanthorpe District. Queensland Agricultural Journal, Februar 1946.

7. Maier, W., Bormangelerscheinungen an Rebsämlingen in Wasserkulturversuchen. Gartenbauwissenschaft **11**, 1—16, 1937.

8. Oinoue, Y., Effect of boron on the setting of grapes in the Muskat of Alexandria. Journ. Hort. Assoc. Japan **9**, 141—143, 1938 (zitiert nach Scott).

9. Röder, W., Eigenartige Rebenerkrankung an der Mosel. Der deutsche Weinbau **13**, 210 bis 212, 1934.

10. Scharrer, K., Biochemie der Spurenelemente. Parey, Berlin 1941.

11. Schmucker, Th., Zur Blütenbiologie tropischer *Nymphaea*-Arten. II. Bor als entscheidender Faktor. Planta, Berlin **18**, 641—650, 1933.

12. Schneiders, E., Die Reisigkrankheit der Rebe. Dissertation Bonn 1934.

13. Schropp, W., Stand der Forschung über das Spurenelement Bor. Zeitschr. f. Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde **51**, 127—139, 1950.

14. Scott, L. E., Boron nutrition of the Grape. Soil Science **51**, 55—65, 1944.

15. Snyder, E. and Harmon, F. N., Some effects of zinc sulfate on the Alexandria grape. Amer. Soc. Hort. Sci. **40**, 325—327, 1942 (zitiert nach Scott).

16. Wilhelm, A. F., Bormangel — die Ursache schwerer Krankheitserscheinungen an Reben. (Vorläufige Mitteilung) Der Weinbau, Heft 16/1950.

17. — —, Bormangel bei Reben. (Literaturübersicht) Der Weinbau, Wissenschaftl. Beihefte **5**, 13—18, 1951.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik*
*der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*

# Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen

Von
E. Gäumann, St. Naef-Roth, P. Reusser
und A. Ammann[1])

*Mit 25 Abbildungen und 11 Tabellen*

Inhalt: Einleitung. — 1. Kapitel. Die Arbeitsmethoden. § 1. Die Bestimmung der dosis minima. § 2. Die Gewebestreifenmethode. § 3. Der Randentest. § 4. Die Unzulänglichkeiten der verwendeten Methoden. — 2. Kapitel. Versuche mit echten Welketoxinen. — 3. Kapitel. Versuche mit Antibiotica. — 4. Kapitel. Versuche mit oberflächenaktiven Stoffen. — 5. Kapitel. Allgemeine Betrachtungen. § 1. Die systematische Stellung der Toxinbildner. § 2. Die chemische Natur der untersuchten Toxine. § 3. Das Molekulargewicht der untersuchten Toxine. § 4. Das Wirkungsspektrum der untersuchten Toxine. § 5. Der Wirkungsgrad der untersuchten Toxine. § 6. Die Beziehungen zwischen Konzentrationsschwelle und Welke-Effekt. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

## Einleitung

Über den Wirkungsmechanismus der Welketoxine (Marasmine) liegen nur wenige Arbeiten vor. Thatcher (1942) stellte abgeschnittene Tomatensprosse in das Filtrat einer vierwöchigen Kultur des *Fusarium lycopersici.* Nach 48 Stunden welkten die Blätter. Der Autor plasmolysierte nunmehr zum Beispiel die Palisadenzellen aus den Interkostalfeldern von gesunden und von welkenden Blättern mit einer 2 O Kalziumchloridlösung und deplasmolysierte sie hernach in einer 0.5 O Kalziumchloridlösung (O ist der durchschnittliche osmotische Wert des Zellsaftes der Testzellen). Dabei verlief die Deplasmolyse in den Palisadenzellen von welkenden Blättern ungefähr doppelt so rasch wie in den gesunden Kontrollen (unsere Abb. 1). Ferner verlief sie in den Blattzellen aus der Mitte der (von bloßem Auge gesehen stärker geschädigten) Interkostalfelder rascher als in der Nähe der (von bloßem Auge weniger geschädigten) Blattnerven.

Der Autor schließt aus diesem Versuch, daß die Wasserpermeabilität der Plasmamembran durch das Welketoxin auf rund den doppelten Betrag erhöht worden sei.

[1]) Herrn Prof. Dr. Hans Fitting, Bonn, zu seinem 75. Jahrestag gewidmet.

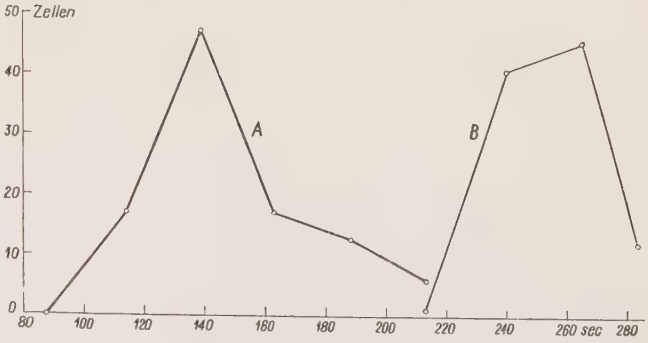



Abb. 1. Die Veränderung der Deplasmolysierungszeit von je 100 Palisadenzellen aus den Interkostalfeldern von Tomatenblättern unter der Einwirkung eines Kulturfiltrates von *Fusarium lycopersici*. Kurve A: geschädigte Zellen. Kurve B: nicht geschädigte Kontrollen. Abszisse: Deplasmolysierungszeit in sec. Ordinate: Anzahl Palisadenzellen, die in der betr. Zeit deplasmolysiert wurden. (Nach THATCHER, 1942)

Zu einem ähnlichen Ergebnis gelangte GOTTLIEB (1944), der nach einer ähnlichen Methode die Deplasmolysierungszeit in den Markzellen der Blattstiele von infizierten und von nichtinfizierten Tomatenpflanzen bestimmte; sie betrug bei den ersteren durchschnittlich 240 sec, bei den letzteren durchschnittlich 645 sec; also ist die Wassergängigkeit der Plasmagrenzschicht in den infizierten Geweben auf den zwei- bis dreifachen Betrag gestiegen.

Ohne diese Arbeiten zu kennen (sie waren uns ja des Krieges wegen auch gar nicht zugänglich), verfolgten wir ein ähnliches Problem an Hand reiner Welketoxine (GÄUMANN, JAAG und BRAUN, 1947; GÄUMANN und VON ARX, 1947). Als Maßstab für die Schädigung der Protoplasten dienten

a) die Hemmung der Plasmolyse bei *Spirogyra*. Fäden einer vielbändrigen *Spirogyra* wurden in die Toxinlösung gelegt und periodisch auf ihre Plasmolysierfähigkeit in 0.8 molar Saccharose untersucht. Als Abszisse diente der Zeitablauf, bis die Plasmagrenzschicht so weit gestört war, daß die Plasmolysierung unterblieb.

b) die Geschwindigkeit der Hemmung der Bewegungsfähigkeit von *Chilomonas Paramaecium* und einer *Colpidium*-Art (ebenfalls einer Infusorie).

c) die Geschwindigkeit der Hemmung der Plasmaströmung von *Elodea canadensis*.

d) der Austritt von Anthocyan aus Randengewebe (roten Rüben, *Beta vulgaris rubra*). Wenn nämlich die Semipermeabilität der Plasmagrenzschichten (Vakuolenwand und Plasmahaut) von Randen gestört wird, so tritt ein Teil des Anthocyans aus den Vakuolen in die Lösung hinaus. Als Maßstab für die Schädigung dient der prozentuale Anteil des gesamten Anthocyans, der innerhalb 24 Stunden in die Lösung hinausgetreten ist.

Dabei ergab es sich, daß die geprüften Welketoxine tatsächlich bei gewissen Modellobjekten Plasmavergiftungen und Semipermeabilitätsstörungen auslösen, ähnlich wie dies THATCHER und GOTTLIEB bei ihren rohen Kulturfiltraten beobachtet hatten. Wir versuchten deshalb in der vorliegenden Arbeit, die Verhältnisse bei einigen Welketoxinen, Antibiotica usw. genauer nachzuprüfen.

Wir gingen von der folgenden Überlegung aus: Falls die schädigende Wirkung eines Welkegiftes wirklich zur Hauptsache auf einer Störung der osmotischen Verhältnisse der Wirtspflanzen beruht, so muß sich die Konzentrationsschwelle für die Permeabilitätsstörung hinlänglich mit der allgemeinen Toxizitätsschwelle des betreffenden Welketoxines decken.

Wir bestimmten deshalb für die in Frage stehenden Toxine die dosis minima, das ist die Toxinmenge je kg Lebendgewicht, die notwendig ist, um unter bestimmten äußeren Verhältnissen an abgeschnittenen Tomatensprossen bestimmte Schädigungen auszulösen; diese dosis minima vermittelt einen Anhaltspunkt über die summarische Giftigkeit des betreffenden Toxins für Tomatensprosse.

Sodann bestimmten wir, ebenfalls für Tomatengewebe, nach der Gewebestreifenmethode die Verdünnungsgrenze, bei welcher das betreffende Toxin keine meßbaren Schädigungen der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten mehr auslöst. Orientierungshalber führten wir ähnliche Versuche mit Geweben von roten Randen durch.

Falls die Schädigung der Tomatensprosse durch das betreffende Toxin vorwiegend auf einer Störung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten beruht, so muß sich die summarische Giftigkeit des betreffenden Toxines für Tomatensprosse (gemessen an Hand der dosis minima) sinngemäß mit der Konzentrationsschwelle für die Schädigung der Permeabilität ihrer Protoplasten (gemessen an Hand der kritischen Verdünnungsgrenze des betreffenden Toxines im Gewebestreifentest) decken.

Falls dies nicht geschieht, so dürfen wir vermuten, daß das betreffende Toxin nicht in erster Linie die osmotischen Eigenschaften, sondern andere Funktionen der Protoplasten schädigt.

## 1. Kapitel

## Die Arbeitsmethoden

Wir gliedern das vorliegende Kapitel in vier Abschnitte, § 1. Die Bestimmung der dosis minima, § 2. Die Gewebestreifenmethode, § 3. Der Randentest und § 4. Die Unzulänglichkeiten der verwendeten Methoden.

### § 1. Die Bestimmung der dosis minima

Mit der dosis minima wird diejenige Toxinmenge in mg je kg Lebendgewicht bestimmt, die unter bestimmten äußeren Bedingungen bei Tomatensprossen ein bestimmtes Ausmaß der Schädigung auslöst.

Die Methode wurde bereits in dieser Zeitschrift durch Gäumann und Jaag (1950) und Gäumann, Naef-Roth und Miescher (1950) besprochen.

Abgesehen von den Fragen der Wirtsspezifität, auf die wir in § 4 kurz zurückkommen werden, liegt eine Hauptschwierigkeit bei der Bestimmung der dosis minima in der gewebespezifischen Wirkung mancher Welketoxine, d. h. in dem Umstand, daß manche Welketoxine nur bestimmte Gewebe des Wirtes sichtbar schädigen; so verursacht Lycomarasmin vorzugsweise eine Nekrose der Interkostalfelder der Laubblätter (GÄUMANN, 1951, Abb. 402), Patulin dagegen vorzugsweise eine Nekrose der Leitungsgewebe der Stengel und Blattstiele (GÄUMANN, 1951, Abb. 403, 406, 407). Die dosis minima wird somit bei Lycomarasmin an Hand anderer Effekte bestimmt als bei Patulin. Die gewonnenen Zahlen lassen sich deshalb nur bei ähnlichen Schädigungsbildern unmittelbar vergleichen, bei den übrigen nur cum grano salis.

Bei Schädigungsbildern vom Typus des Lycomarasmins verwendeten wir das folgende Bonitierungsschema:

0 keine sichtbare Wirkung
1 Blattspitzen geschädigt
2 Blattspitzen und Blattränder geschädigt; erstes Fiederblatt mit vereinzelten Fleckennekrosen
3 Blattspitzen und Blattränder geschädigt; sämtliche Fiederblätter mit Fleckennekrosen
4 alle Fiederblätter mit starken Fleckennekrosen bedeckt

Bei Schädigungsbildern, die nicht dem Lycomarasmintypus folgen, wurde das Bonitierungsschema jeweils sinngemäß der Lycomarasmin-Abstufung angepaßt und nötigenfalls an Ort und Stelle näher besprochen.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Bestimmung der dosis minima liegt in der Wahl der Giftkonzentration. Wird nämlich ein Toxin, das die Leitungsbahnen des Wirtes schädigt (z. B. Patulin und unter bestimmten Voraussetzungen die Fusarinsäure), in einer zu hohen Konzentration verabreicht, so löst es zugleich heftige akute Nekrosen an den Stengeln aus und versperrt sich dadurch (da ja die Pflanzen die Toxinlösung aufsaugen müssen) selbst den Weg in die Blattstiele und Blattspreiten hinauf. Dadurch wird jedoch die Grundlage für die Bonitierung verfälscht. Um diese Fehlerquelle nach Möglichkeit auszuschalten, arbeiteten wir bei der Bestimmung der dosis minima, soweit tunlich, mit ähnlichen Toxinkonzentrationen, nämlich mit etwa $10^{-3}$ molar.

Eine dritte Schwierigkeit bei der Bestimmung der dosis minima liegt in der Wahl der Einwirkungsdauer des Toxines: In welchem Zeitpunkt soll nach erfolgter Aufnahme des Toxines die entscheidende Ablesung erfolgen? Bei einem kurzen Einwirkungsintervall geben schwache Toxine nur niedrigliegende Punkte, so daß die mittlere Gerade bloß in der Nähe der Abszisse gesichert ist. Bei einem langen Einwirkungsintervall ebnen sich anderseits die Effekte bei starken Toxinen aus; denn die Blätter können nicht mehr als nekrotisch zerstört sein. Überdies ist es möglich, daß die Wirkungskurve nicht bei sämtlichen Toxinen linear mit der Zeit verläuft; die einen mögen anfänglich rasch wirken und dann frühzeitig ausklingen; andere mögen langsam anlaufen und sich dann nachhaltig steigern. Alle diese Versuche, z. B. mit Abszisse Einwirkungszeit oder mit Abszisse Konzentration, würden jedoch Jahre der Arbeit beanspruchen.

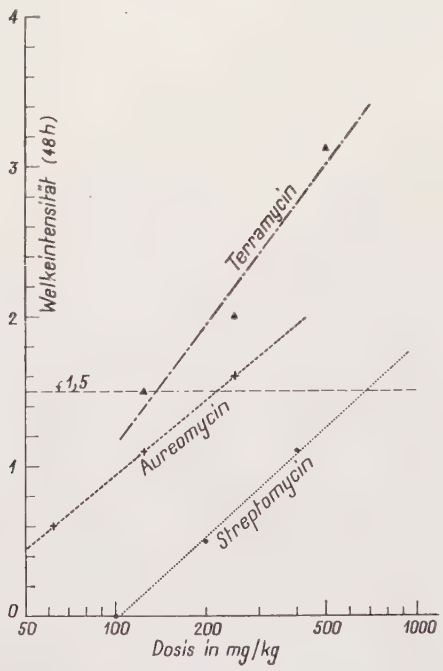



Abb. 2. Der Welke-Effekt von drei Antibiotica bei Tomatensprossen nach 48stündiger Einwirkung. Das Terramycin wurde in der Konzentration von $2.2 \cdot 10^{-3}$ molar, das Aureomycin in der Konzentration von $10^{-3}$ molar und das Streptomycin in der Konzentration von $1.25 \cdot 10^{-3}$ molar verwendet

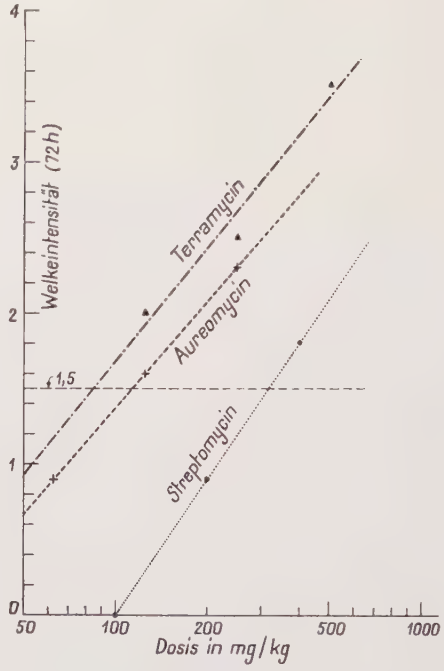



Abb. 3. Der Welke-Effekt von drei Antibiotica bei Tomatensprossen nach 72stündiger Einwirkung

Um uns immerhin ein Bild über die Tragweite dieser Fehlerquelle zu machen, haben wir in Abb. 2 und 3 für drei Antibiotica die Ergebnisse einiger Tastversuche mit 48- und mit 72stündiger Einwirkungsdauer graphisch dargestellt. Es handelt sich um nicht mehr als um Tastversuche, bei welchen die mittlere Gerade nur durch wenige Meßpunkte (meist nur durch die minimale Zahl von ihrer drei) bestimmt wird.

Zunächst ist in den beiden Abbildungen wesentlich, daß die Reihenfolge der drei Geraden sich bei beiden Einwirkungszeiten gleichbleibt; es wird also im Falle des vorliegenden Beispieles durch eine Verlängerung der Einwirkungszeit nichts Grundsätzliches geändert.

Einen weitern Maßstab für den eventuell störenden Einfluß der Einwirkungsdauer des Toxines bilden die Schnittpunkte der mittleren Geraden mit der 1.5-Achse, die wir ja als Kennzahlen für die dosis minima verwenden; sie sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Bei Aureomycin braucht es, wenn die Einwirkungszeit um die Hälfte verlängert wird, nur halb soviel Substanz, um denselben Schädigungseffekt zu erzielen, bei Terramycin etwas mehr, bei

*Tabelle 1*

Der Einfluß der Einwirkungsdauer auf die Symptomausprägung bei drei Antibiotica.

Die Zahlen geben die Giftmenge in mg je kg Lebendgewicht wieder, die in dem genannten Zeitintervalle eine mittlere Erkrankungsintensität von 1.5 auslöst

| Toxin | 48 Stunden mg | 72 Stunden mg |
|---|---|---|
| Terramycin | 135 | 85 |
| Aureomycin | 220 | 115 |
| Streptomycin | 680 | 320 |

Streptomycin etwas weniger als die Hälfte; doch sind diese Abweichungen statistisch nicht gesichert. Im gegenwärtigen Stadium der Arbeit begehen wir somit keinen allzu großen Fehler, wenn wir die Einwirkungsdauer des Toxines summarisch auf 48 Stunden festsetzen und die feinere Differenzierung einer späteren Forschung überlassen.

In diesem Sinne bezeichnen wir als dosis minima jene Giftmenge je kg Lebendgewicht, die (soweit möglich) in der Konzentration von etwa $10^{-3}$ molar bei der Lufttemperatur von rund 23° C, bei der Luftfeuchtigkeit von rund 55% und bei einer konstanten künstlichen Belichtung innerhalb 48 Stunden bei jungen Tomatensprossen die mittlere Schädigung von 1.5 auslöst. Dieser Wert ist naturgemäß, wie sämtliche toxikologische Kennzahlen (z. B. $LD_{50}$), willkürlich festgesetzt; wesentlich war nur, daß er in einem Bereich liegt, bei welchem die schwach wirkenden Toxine nicht allzusehr extrapoliert werden müssen.

## § 2. Die Gewebestreifenmethode

Versuchsfrage: Bei welcher Giftkonzentration wird im Grundgewebe von Tomatenblättern die wasserhaltende Kraft der Protoplasten und die Wasserwegsamkeit des Plasmas meßbar gestört?

Wir verwendeten die Methode von Ursprung und Blum (1916), Ursprung (1923) und Pringsheim (1931). Diese Autoren haben gezeigt, daß Gewebestreifen, die aus Blättern herausgeschnitten und dadurch aus ihrem natürlichen Zusammenhang herausgerissen werden, sehr fein auf die osmotischen Verhältnisse des Mediums, z. B. einer Rohrzuckerlösung, ansprechen; sie erfahren nämlich in hypotonischen Lösungen infolge erhöhter Wasseraufnahme eine Turgordehnung, also eine Streckung (Verlängerung), in hypertonischen Lösungen dagegen infolge Wasserentzugs eine Schrumpfung (Verkürzung). Ursprung und Blum bestimmten den osmotischen Zustand der Gewebezellen durch diejenige Konzentration der Lösung, die keine Veränderung der ursprünglichen Länge der Gewebestreifen bewirkt.

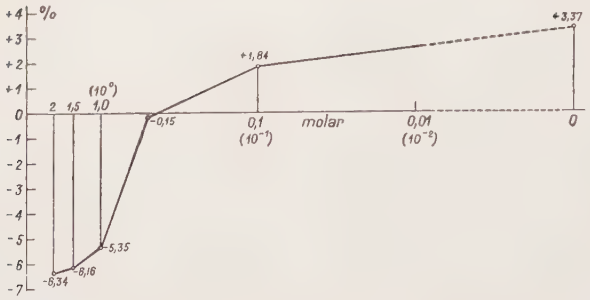



Abb. 4. Die Längenveränderungen von Gewebestreifen aus jungen Tomatenblättern in einer Rohrzuckerlösung. Abszisse: Rohrzuckerkonzentration in Mol, logarithmisch dargestellt. Ordinate: Längenveränderung der Gewebestreifen in Prozent der ursprünglichen Länge

Abbildung 4 veranschaulicht in semilogarithmischer Darstellung die Streckung bzw. Verkürzung von Gewebestreifen aus Tomatenblättern in verschieden konzentrierten Rohrzuckerlösungen; sie zeigt zugleich, in welchem Ausmaß die Grundgewebe junger Tomatenblätter infolge ihrer beschränkten Elastizität auf die Konzentrationsänderungen der Außenlösung (Rohrzucker) zu antworten vermögen. Der Nullwert, das ist die Konzentration der Außenlösung, bei welcher keine Längenveränderung der Gewebestreifen erfolgt, liegt bei 0.44 molar.

Nimmt die Konzentration von diesem Schwellenwert aus zu, so verkürzen sich die Gewebestreifen bis maximal 6 bis 7 % bei der Konzentration von 2 molar Saccharose. Nimmt die Konzentration vom Nullwert aus ab, so strecken sich die Gewebestreifen bis maximal rund 3 % in destilliertem Wasser.

Werden nun die Protoplasten durch Toxine geschädigt, so verringert sich einerseits ihre wasserhaltende Kraft; anderseits wird offenbar auch die Wasserwegsamkeit des Plasmas und die Semipermeabilität der Plasmahaut geschädigt, so daß das freiwerdende Wasser samt gewissen osmotisch wirksamen Stoffen aus dem Zellinnern ins Freie tritt; der Wanddruck wird infolgedessen nicht mehr durch den Turgordruck aufgefangen, und so verkürzen sich die Gewebestreifen auch in hypotonischen Lösungen, und zwar irreversibel.

Wir gingen folgendermaßen vor: Junge Tomatenblätter möglichst gleichen Alters werden abgeschnitten, in Wasser gestellt und bei Zimmertemperatur einige Stunden aufbewahrt. Dann werden mit einer Rasierklinge aus den Interkostalfeldern, senkrecht zu den sekundären Blattnerven, Streifen von etwa 1 mm Breite und 5 bis 10 mm Länge geschnitten, in Wasser gelegt und an die Vakuumpumpe angeschlossen, um die Luft aus den Interzellularen herauszusaugen (Strugger, 1949). Bald bilden sich an der Oberfläche der Gewebestreifen Luftbläschen und lösen sich allmählich ab. Dann wird der Druck rasch gesteigert, und die Interzellularen füllen sich mit Wasser. Dies wird wiederholt, bis die Gewebestreifen bei normalem Druck nicht mehr an der Wasseroberfläche schwimmen. Die Gewebe sind dann halb durchsichtig, was auch die Messung erleichtert.

Diese Vakuumbehandlung der Gewebestreifen erwies sich als notwendig, weil sonst die Giftlösungen nicht immer gleichmäßig in die Blattgewebe eindringen, wodurch Unregelmäßigkeiten entstehen.

Für die Ausmessung der Gewebestreifen wurde ein Streifen Millimeterpapier in derjenigen Entfernung photographiert, welche die Reduktion 1 : 5 ermöglichte, also 1 Teilstrich = 0,2 mm. Dann wurde das in Frage kommende Glasstück nach Art eines Objektträgers herausgeschnitten und zum Schutze der empfindlichen Schicht mit einem dünnen Deckglas überklebt. Die Länge des Gewebestreifens ließ sich auf diesem Objektträger gut messen, vor allem, wenn man noch ein Okularmikrometer zu Hilfe zog. Der Ablesefehler betrug etwa 0,02 mm. Naturgemäß kamen noch gewisse von den Geweben selbst verursachte Fehler hinzu.

Pro Versuchslösung wurde die Veränderung von 10 bis 20 Gewebestreifen gemessen; wir geben sie in % der ursprünglichen Länge wieder. Versuchstemperatur Zimmertemperatur. Die Mittelwerte aus den verschiedenen Versuchsserien wurden jeweils in den Abbildungen gesondert durch Kreuze, Punkte usw. markiert.

Da wir bei unseren Versuchen stets mit starken Verdünnungen der Gifte arbeiten, von $10^{-2}$ molar abwärts, so müßten die Gewebestreifen, soweit rein osmotisch der Konzentrationseffekt der Lösung in Frage kommt, an Länge zunehmen, entsprechend unserem punktierten Kurvenstück zwischen 0.1 und 0 molar in Abb. 4. Daß dies nicht geschieht, sondern daß im Gegenteil eine Längenabnahme der Gewebestreifen erfolgt, darin drückt sich der toxische Effekt der betreffenden Welkesubstanz aus.

Und unsere Frage ist nun: Bei welcher Konzentration des Toxines bleibt die Länge der Gewebestreifen unverändert, bei welcher Toxinkonzentration erfolgt somit weder eine Zu- noch eine Abnahme der Längen der Gewebestreifen? Da in Abb. 4 die Längenveränderung der Gewebestreifen in stark verdünnten Lösungen (unterhalb $10^{-1}$ molar) ungefähr linear mit der Konzentrationsänderung verläuft, so haben wir jeweils aus sämtlichen Meßserien die mittlere Gerade berechnet, die durch den Schwerpunkt geht und bei der die Summe der Abweichungen der einzelnen Punkte ein Minimum erreicht. Der Schnittpunkt dieser mittleren Geraden mit der x-Achse gibt die Konzentration an, bei der die Gewebestreifen ihre Länge nicht mehr verändern; dies ist die von uns gesuchte Störungsschwelle.

Charakteristisch bei all diesen Messungen ist also nicht das absolute Ausmaß der Dehnung bzw. Verkürzung der Gewebestreifen; denn dieses Ausmaß hängt jeweils von der zufälligen Elastizität des geprüften Blattes ab; so ist bei dem für Abb. 4 geprüften Blatt die Streckung in den hypotonischen Lösungen mit rund 3 % in dest. Wasser ungewöhnlich hoch; sondern charakteristisch ist die Lage des Nullpunktes, des Schnittpunktes der Längenveränderungsgeraden mit der x-Achse.

Dieser Nullwert erweist sich bei Wiederholungen als hinreichend konstant und ist deshalb praktisch brauchbar. Da aber das Wissen um den Elastizitätsgrad jedes einzelnen Blattes doch eine gewisse Beruhigung hinsichtlich der Tragfähigkeit der betreffenden Meßserie gewährt, so haben wir bei jeder Versuchsserie das Verhalten der Gewebestreifen in dest. Wasser bestimmt und

die betreffenden Werte als Kontrollwerte stillschweigend am Bildrand abgetragen.

Leider erwies es sich als unmöglich, die Einwirkung des Giftes an Hand der Verkürzung der Gewebestreifen in der Zeiteinheit zu verfolgen. Das Material ist hinsichtlich der Dicke der Kutikula, der Spaltöffnungszahl, der Elastizität der Zellwände, der Duktilität des Plasmas usw. von einem Blatt zum anderen zu verschieden, als daß absolute Werte hätten bestimmt werden können. Was wir zu bestimmen vermögen, ist nur die Längenveränderung nach einer bestimmten Zeit, nämlich nach 20 bis 24 Stunden.

Abb. 5 veranschaulicht zum Schluß den Gang der Arbeit für Patulin. Wir gingen, wie immer, von der Konzentration von $10^{-2}$ molar aus und

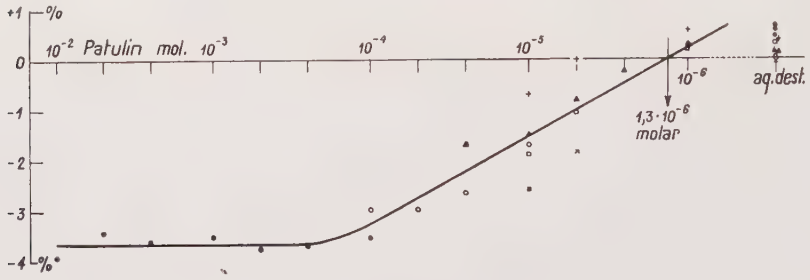



Abb. 5. Die Längenveränderungen der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Patulin-Lösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-6}$ molar

schritten zu stets stärkeren Verdünnungen fort. Falls die osmotischen Bedingungen als solche ausschlaggebend wären, so müßte bei der Konzentration von $10^{-2}$ molar, ähnlich der Abb. 4, eine Streckung der Gewebestreifen um 1 bis 2 % eintreten; die Meßpunkte müßten somit über der x-Achse liegen; statt dessen erfolgt in Abb. 5 infolge der Giftwirkung des Patulins eine Verkürzung der Gewebestreifen um 3 bis 4 % (d. h. die Meßpunkte liegen weit unter der x-Achse), und wir mußten bis zur Konzentration von $10^{-4}$ molar weitergehen, bis die pathologische Schrumpfung der Blattgewebe kleiner zu werden begann.

Zwischen den Konzentrationen von $10^{-2}$ und $10^{-4}$ molar ist demnach die Giftwirkung des Patulins derart stark, daß die osmotischen Voraussetzungen der Protoplasten sogleich zerstört werden, so daß die Gewebestreifen auf eine Konzentrationsänderung überhaupt nicht ansprechen. Der Wendepunkt ihres Verhaltens liegt erst bei $10^{-4}$ molar. Aus Gründen der Raumersparnis wird jeweils in unseren späteren Abbildungen nicht der gesamte durchschrittene Meßbereich dargestellt, sondern nur das kritische Kurvenstück, das die x-Achse schneidet; aus den Meßpunkten dieses kritischen Meßbereiches wurde jeweils die mittlere Gerade berechnet, und aus ihr der Schnittpunkt mit der x-Achse, eben der gesuchte Nullpunkt.

In der nachfolgenden Darstellung bezeichnen wir diesen Schnittpunkt der mittleren Geraden mit der x-Achse kurzerhand als den „Schwellenwert für

die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten". Dieser Ausdruck ist jedoch cum grano salis zu nehmen.

Gewebestreifen mit unbeschädigten Protoplasten würden nach Abb. 4 in derart verdünnten Lösungen, wie wir sie im Bereich unseres Nullpunktes verwenden, eine Längenzunahme aufweisen; daß sie dies in unseren Toxinlösungen nicht tun, beweist, daß sie dort schon eine gewisse toxigene Schädigung erfahren haben. Der wahre biologische Nullpunkt der Gewebestreifenmethode liegt dort, wo das betreffende Toxin eben meßbar zu wirken beginnt, also dort, wo die Streckung der Gewebestreifen eben beginnt, sich nicht mehr voll auszuwirken. Er liegt somit unmittelbar unterhalb des für aqua dest. festgestellten maximalen Dehnungswertes.

Wenn wir dennoch in der nachfolgenden Darstellung nicht mit diesem wahren biologischen Nullpunkt arbeiten, sondern willkürlich den Schnittpunkt der mittleren Geraden mit der x-Achse als den Nullpunkt bezeichnen, so hat dies ausschließlich einen methodischen Grund: Der Schnittpunkt der mittleren Geraden mit der x-Achse läßt sich genau berechnen, während die Extrapolierung der mittleren Geraden bis hinauf zu den aqua dest.-Grenzwerten mit erheblichen Unsicherheiten behaftet wäre.

Praktisch wird durch die Wahl eines künstlichen Nullpunktes nicht viel verschoben. Der wahre biologische Schwellenwert liegt zwar, dies bleibt stets zu bedenken, bei einer etwas schwächeren Verdünnung, als wir mit unserem Nullpunkt angeben; da jedoch die Steigung der meisten mittleren Geraden ungefähr gleich ist, so bleibt auch der Fehler, den wir durch die Wahl eines künstlichen Nullpunktes begehen, stets ungefähr gleich groß, d. h. die Werte bleiben vergleichbar.

## § 3. Der Randentest[1])

Falls ein Welketoxin die Semipermeabilität der Vakuolenwand und der Plasmahaut bei roten Randen (rote Rüben, *Beta vulgaris rubra)* schwer schädigt, so werden diese Grenzschichten selbst für große Molekel wie Anthocyan durchlässig; das Anthocyan diffundiert deshalb aus den Vakuolen durch das Plasma in die umgebende Lösung hinaus. Beim „Randentest" (Gäumann, Jaag und Braun, 1947; Gäumann und von Arx, 1947) wird der Schwellenwert der Toxinkonzentration bestimmt, bei der kein Anthocyan mehr ins Freie tritt.

Aus Randengewebe werden Scheibchen von 6,5 mm Durchmesser und 3 mm Dicke gestanzt und in destilliertem Wasser so lange ausgewaschen, bis keine Spur von Farbstoff mehr austritt. Zu je 50 Scheibchen werden in kleinen Erlenmeyern je 9 ml des zu untersuchenden Toxines in Konzentrationen von $10^{-1}$ bis $10^{-5}$ molar zugegeben, und die Lösungen werden während 24 Stunden zu 4° C gestellt. Das pH der Testlösung variierte zwischen 5.8 bis 6.0 (Penicillsäure 5.2). Jedes Toxin wurde in zwei bis vier Parallelversuchen getestet, wobei für jede Parallelreihe eine neue Randenknolle

[1]) Die in der vorliegenden Arbeit mitgeteilten Messungen wurden zur Hauptsache durch unseren Mitarbeiter Dr. Lukas Stalder ausgeführt.

verwendet und eine Kontrolle mit destilliertem Wasser angesetzt wurde. Die Vergleichslösung wurde folgendermaßen hergestellt: 100 der oben erwähnten Randenscheibchen wurden mit etwas Quarzsand im Mörser zu einem feinen Brei zerrieben, und das Anthocyan wurde im Faltenfilter mit 100 ml dest. Wasser ausgewaschen. Die Farbintensität dieser Lösung, die dem gesamten Anthocyangehalt von 100 Randenscheibchen entspricht, wurde als 100 % angenommen. Im Kolorimeter wurden die Lösungen der Versuchsreihe mit der Vergleichslösung verglichen, und das herausgelöste Anthocyan wurde in % der Vergleichslösung ausgedrückt. Da der Farbton des Randenextraktes von Sorte zu Sorte und zuweilen von einem Individuum zum andern etwas wechselt, so muß die Vergleichsskala für jede einzelne Rande gesondert bestimmt werden.

Der Randentest bestimmt somit die pathologische Wegsamkeit der Plasmagrenzschichten und des Plasmas für große Molekel wie das Anthocyan. Er beruht also auf einer viel weitergehenden toxigenen Permeabilitätsstörung als die Gewebestreifenmethode. Diese letztere untersucht die Störung der wasserhaltenden Kraft und die Störung der Wasserwegsamkeit des Plasmas, so wie Höfler (1950) sie diskutiert hat. Der Randentest beruht dagegen auf einer derart weitgehenden Koagulation des Plasmas, der Vakuolenwand und der Plasmagrenzschichten, daß alle drei gleich einem grobmaschigen Sieb das Anthocyan passieren lassen. Der Schwellenwert wird deshalb für die Gewebestreifenmethode in der Regel bei einer erheblich schwächeren Konzentration liegen als beim Randentest.

Vielleicht läßt sich bei späteren Untersuchungen die Koagulasewirkung der Welketoxine noch feiner messen, als dies mit dem Randentest geschieht, z. B. in der Weise, daß man den Austritt von Enzymen aus dem Zellinnern in die Lösung hinaus bestimmt, statt den Austritt des Anthocyans wie beim Randentest. Doch ist uns im Augenblick keine entsprechende Testmethode, die sich für Serienversuche eignen würde, bekannt.

### § 4. Die Unzulänglichkeiten der verwendeten Methoden

Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Methoden sind mit zwei Gruppen von Unzulänglichkeiten behaftet, die in der Wahl der Testobjekte und in der Diskongruenz der geprüften Effekte begründet liegen.

Zunächst die Wahl der Testobjekte. Soweit möglich, verwenden wir Tomatenpflanzen als Testobjekte; an Hand der Grundgewebe ihrer Blattspreiten messen wir die Störung der osmotischen Verhältnisse der Protoplasten, und an jungen Sprossen junger Individuen bestimmen wir die dosis minima, die für die Auslösung bestimmter Nekrosen notwendig ist. Nur für den „Randentest" dienen andere Gewebe einer anderen Pflanze.

Durch diese Einheit des Objektes werden sämtliche Ergebnisse ohne weiteres vergleichbar; doch schafft diese Beschränkung auf ein Objekt die Gefahr erheblicher Fehlerquellen.

Durch die Beschränkung auf eine Gewebeart vernachlässigen wir nämlich die gewebespezifische Wirkung mancher Welketoxine. Lycomarasmin verursacht in erster Linie Nekrosen in den Blattspreiten der Fiederblättchen; Patulin schädigt dagegen in erster Linie die Leitungsbahnen und die ihnen benachbarten Grundgewebe des Stengels. Wir wissen jedoch nicht, ob diese gewebespezifische Wirkung auf einer besonderen Empfindlichkeit, einer besonderen Sensibilität der betreffenden Gewebe für das betreffende Toxin beruht oder ob sie durch eine spezifische Anreicherung des betreffenden Toxins in den betreffenden Geweben (auf Grund einer besonderen Affinität des betreffenden Toxins für die betreffenden Gewebe) gesteuert wird. Durch die Wahl einer Gewebeart, nämlich der Grundgewebe aus den Blattspreiten als Testobjekt, schreiten wir kurzerhand über diesen gewebespezifischen Effekt hinweg.

Anderseits vernachlässigen wir durch die Beschränkung auf eine Wirtsart das spezifische Wirkungsspektrum mancher Welketoxine; so sprechen Tomatenpflanzen, wie wir später in einer anderen Arbeit berichten werden, auf die Welketoxine der *Nectria cinnabarina* nur schlecht an. Und umgekehrt ist bekannt, daß wirtsfremde Pflanzenarten unter Umständen auf die Toxine eines bestimmten Welke-Erregers empfindlicher antworten als der spezifische Wirt des betreffenden Erregers selbst; so vermag das *Fusarium lycopersici* die Pelargonien und Weinreben nicht zu befallen; aber die dosis minima liegt bei gewissen *Pelargonium*- und *Vitis*-Rassen niedriger als bei den Tomatenpflanzen.

Durch die Wahl eines Testobjektes für die Testung der Toxizität sämtlicher Toxine laufen wir also Gefahr, inadäquate Werte zu erhalten, die zu gegebener Zeit an Hand der spezifischen Wirte verifiziert werden müssen. Mit dieser Schwierigkeit hat aber die Toxikologie auch in der Human- und Veterinärmedizin (wo als Testobjekte Meerschweinchen, Ratten, Mäuse usw. dienen) zu kämpfen.

Die zweite Unzulänglichkeit liegt in der Diskongruenz der geprüften Effekte begründet. Der Welke-Effekt, der als Grundlage für die Bestimmung der dosis minima dient, setzt sich aus mindestens drei Teilschritten zusammen,

a) aus der Anhäufung oder Anreicherung des pathogenen Agens in den sensiblen Geweben, bis die Reaktionsschwelle erreicht ist;
b) aus der chemischen Reaktion des pathogenen Agens mit den Zellinhalten oder mit den Stoffwechselbestandteilen des Wirtes; und
c) aus der Unterbrechung der normalen Funktion des Wirtes durch diese Reaktion.

Was wir bei der Bestimmung der dosis minima grobsinnlich als Nekrosen, Turgorstörungen (Welke-Erscheinungen) usw. wahrnehmen und bonitieren, sind erst die unspezifischen letzten Folgen der Schädigungen, erst die visuell wahrnehmbar gewordenen letzten Glieder der Reaktionskette. Mit der Gewebestreifenmethode und mit

dem Randentest untersuchen wir dagegen, ob in dieser Reaktionskette bestimmte Aktionsschritte auftreten und, wenn ja, in welchem Ausmaß.

Diese andere Blickführung kommt in einer Diskrepanz der gemessenen Empfindlichkeit und in einer Diskrepanz der verwendeten Dimensionen zum Ausdruck. Die unterschiedliche Empfindlichkeit: das unspezifische letzte Glied der Reaktionskette (eben meist der Zelltod, die Nekrobiose) spricht wahrscheinlich weit weniger sensibel auf die Toxine an als die ihm vorangehenden spezifischen Aktionsschritte. Die unterschiedlichen Dimensionen: Wir bestimmen die dosis minima an Hand einer bestimmten Giftmenge, die ein Sproß je kg Frischgewicht aufnehmen muß, um bestimmte Schädigungen zu erfahren, und definieren anderseits die Wirkungsschwelle bei der Gewebestreifenmethode und beim Randentest durch eine bestimmte Giftkonzentration, die in den Grundgeweben erreicht werden muß, damit ein bestimmter Störungseffekt eintritt.

Es besteht kaum eine Möglichkeit, all diesen Unzulänglichkeiten auszuweichen; man wird sich deshalb ihrer bei der Auswertung der Versuchsergebnisse stets bewußt bleiben müssen.

## 2. Kapitel

## Versuche mit echten Welketoxinen

Wir besprechen zunächst drei Welketoxine, die von *Fusarium*-Arten gebildet werden (Lycomarasmin, Fusarinsäure und Enniatin), und hernach zwei Welketoxine anderer Provenienz (Alternariasäure und Patulin).

### § 1. Lycomarasmin

Lycomarasmin wird vom *Fusarium lycopersici* Sacc., dem Erreger einer Welkekrankheit der Tomatenpflanzen, gebildet; es ist bis jetzt nur von diesem Erreger bekannt und ist chemisch ein Dipeptid von der Summenformel $C_9H_{15}O_7N_3$ und dem Molekulargewicht 277.3 (Clauson-Kaas, Plattner und Gäumann, 1944; Plattner und Clauson-Kaas, 1944, 1945; Plattner, Clauson-Kaas, Boller und Nager, 1948; Boller, 1951).

Die durch Lycomarasmin ausgelösten Schädigungen an Tomatensprossen wurden durch Gäumann und Jaag (1946, 1947) besprochen.

Die dosis minima wurde von Gäumann, Naef-Roth und Miescher (1950) für verhältnismäßig konzentrierte Toxinlösungen (z. B. $10^{-2.5}$ molar) auf rund 150 mg je kg Lebendgewicht bestimmt. Doch hängt die Toxizität des Lycomarasmins stark von der Umwelttemperatur ab; sie wächst mit steigender Temperatur, und zwar im Intervall der Lufttemperaturen von 12 bis 30° C auf rund das Vierfache (Gäumann und Naef-Roth, 1950).

Das Wirkungsspektrum des Lycomarasmins ist verhältnismäßig eng; so wirkt das Lycomarasmin auf die Plasmastörung von *Elodea* und auf den Anthocyanaustritt bei Randengeweben nicht ein; der Randentest kann des-

halb bei Lycomarasmin nicht verwendet werden (GÄUMANN, JAAG und BRAUN, 1947). Auch bei Tomatenblättern (Gewebestreifenmethode) ist der störende Effekt des reinen Lycomarasmins auf die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten sehr gering; der Schwellenwert liegt in Abb. 6 bei einer Konzentration von $1.18 \cdot 10^{-2}$ molar, also dicht bei jener Konzentrationsgrenze, bei der die Außenlösung unmittelbar osmotisch zu wirken beginnt (Abb. 4).

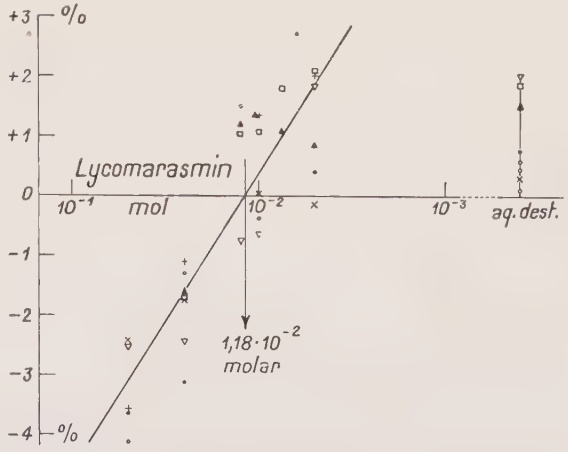



Abb. 6. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in reinen Lycomarasminlösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-1}$ bis $5 \cdot 10^{-3}$ molar

Mehrere Gründe sprechen dafür, daß das Lycomarasmin bei natürlichen Infektionen nicht als reines Lycomarasmin auf die Wirtszellen einwirkt, sondern sich unmittelbar nach dem Eintritt in die Wirtszellen mit den dort verfügbaren Eisenverbindungen zu einem äquimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex verbindet (GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER, 1950; GÄUMANN, KERN und SAUTHOFF, 1952).

Die dosis minima für den äquimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex beträgt etwa 15 mg je kg Frischgewicht; sie ist also rund zehnmal niedriger als bei reinem Lycomarasmin, d. h. der äquimolare Lycomarasmin-Eisen-Komplex ist rund zehnmal giftiger als reines Lycomarasmin. Dementsprechend liegt auch in Abb. 7 der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten bei einer Konzentration von $9.0 \cdot 10^{-4}$ molar, also rund zehnmal tiefer als in Abb. 6 für reines Lycomarasmin.

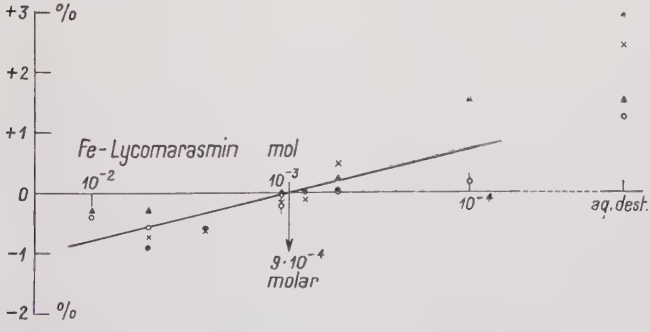



Abb. 7. Die Längenveränderungen der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-4}$ molar

Es fällt auf, daß in Abb. 6 und 7 die Steigung der mittleren Geraden völlig verschieden ist, außerordentlich steil bei reinem Lycomarasmin und

verhältnismäßig flach beim äquimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex. Die Ursache dieses unterschiedlichen Verhaltens ist uns unbekannt. McCallan, Wellman und Wilcoxon (1941, S. 55 u. f.) diskutieren ähnliche Steilheitsverschiedenheiten für die Hemmung der Sporenkeimung durch verschiedene Fungizide und kommen zu dem Schluß, daß der Grad der Steilheit vorwiegend durch die chemische Substanz und nicht durch die Art der als Testobjekte verwendeten Pilzsporen bedingt wird. Worin sie aber begründet liegt, ist noch unentschieden; vielleicht spielt die Permeierfähigkeit der betreffenden chemischen Substanz eine erhebliche Rolle.

## § 2. Fusarinsäure

Das *Fusarium lycopersici* bildet, wie Gäumann, Kern und Sauthoff (1952) und Gäumann (1951) kurz berichtet haben, neben dem Lycomarasmin noch mindestens ein zweites Toxin, nämlich die Fusarinsäure, eine Pyridinkarbonsäure. Sie ist chemisch 5-n-butyl-Pikolinsäure mit der Bruttoformel $C_{10}H_{13}O_2N$ und dem Molekulargewicht 179. Außer durch das *Fusarium heterosporum* Nees, für welchen Pilz sie zuerst durch Yabuta, Kambe und Hayashi (1934) nachgewiesen wurde, und durch das *Fusarium lycopersici* Sacc. wird Fusarinsäure auch durch das *Fusarium vasinfectum* Atk., den Erreger der Baumwollwelke, und durch die *Gibberella Fujikuroi* (Saw.) Wr., einem Erreger der Bakanaëkrankheit des Reises usw., produziert. Ob alle diese Fusarinsäuren vollkommen miteinander identisch sind oder ob es sich bei ihnen, wie bei den Penicillinen, um eine Gruppe nahe verwandter, jedoch von den verschiedenen Erregern in etwas verschiedener Form gebildeter Stoffe handelt, wird die Zukunft lehren.

Über die pathogenen Eigenschaften der Fusarinsäure und über ihre sonderbaren Synergismen haben Gäumann, Naef-Roth und Kobel (1952) zwei vorläufige Mitteilungen veröffentlicht; sie hoffen, im Laufe dieses Jahres in der vorliegenden Zeitschrift eingehender über dieses interessante Toxin berichten zu können.

Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an jungen Tomatensprossen beträgt bei reiner Fusarinsäure 158 mg je kg Lebendgewicht, also gleich viel wie bei reinem Lycomarasmin.

Trotz dieser gleichen summarischen Giftigkeit der Fusarinsäure und des Lycomarasmins ist jedoch die schädigende Wirkung der Fusarinsäure auf die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten etwa 400 mal größer als bei reinem Lycomarasmin. Der Schwellenwert der schädigenden Konzentration liegt nämlich in Abb. 8 bei $2.8 \cdot 10^{-5}$ molar, gegen $1.18 \cdot 10^{-2}$ molar bei reinem Lycomarasmin (Abb. 6) und $9.0 \cdot 10^{-4}$ molar beim äquimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplex (Abb. 7). Wenn also Thatcher (1942) gezeigt hat, daß rohe Kulturfiltrate des *Fusarium lycopersici* die Semipermeabilität der Tomatengewebe stark schädigen (vgl. Abb. 1 der vorliegenden Arbeit), so ist dieser Effekt wahrscheinlich mehr der Fusarinsäure als dem Lycomarasmin zuzuschreiben.

Im Randentest wurden durch Fusarinsäure bei einer Konzentration von $10^{-2}$ molar 20,1% des Anthocyans herausgelöst, bei der Konzentration von $10^{-3}$ molar nur noch Spuren. Der Schwellenwert liegt also in der Nähe von $10^{-3}$ molar.

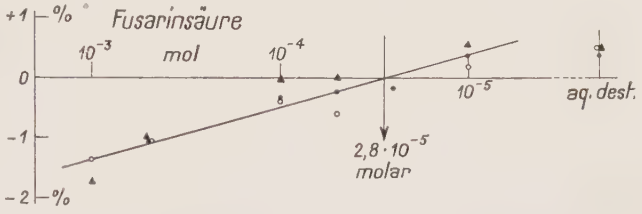



Abb. 8. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in reinen Fusarinsäure-Lösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-3}$ bis $10^{-5}$ molar

## § 3. Enniatin

Enniatine sind antibiotisch wirkende Polypeptide von besonderer Konfiguration (Zehnder, 1951), die von verschiedenen Fusarien, unter ihnen *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc., *Fus. oxysporum* Schlecht., *Fus. sambucinum* Fckl. und *Fus. scirpi* Lamb. et Fautr., gebildet werden. Wir haben über sie schon früher in dieser Zeitschrift berichtet (Gäumann, Naef-Roth und Ettlinger, 1950).

In der vorliegenden Arbeit befassen wir uns ausschließlich mit dem Enniatin A, das die Bruttoformel $C_{24}H_{42}O_6N_2$ und das Molekulargewicht 455 besitzt. Mit ihm ist das Lateritiin I von Cook, Cox, Farmer und Lacey (1947) und von Cook, Cox und Farmer (1948) identisch.

Das Welkebild des Enniatins A an Tomatensprossen folgt dem Patulintypus und kennzeichnet sich durch heftige Schädigungen der Stengel. Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen liegt bei 15 mg je kg Lebendgewicht.

Die Feststellung der Konzentrationsschwelle, bei der die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von Tomatenblättern noch eben geschädigt werden, stieß, wie Abb. 9 erkennen läßt, auf Schwierigkeiten, weil die Meßpunkte nicht auf einer Geraden liegen. Wir haben deshalb die Meßbereiche von $10^{-5}$, $5.0 \cdot 10^{-6}$ und $10^{-7}$ molar ausgeschaltet und die mittlere Gerade nur aus den Bereichen zwischen $2.5 \cdot 10^{-6}$ molar und $5.0 \cdot 10^{-7}$ molar berechnet. Der entsprechende Schnittpunkt liegt bei $9.7 \cdot 10^{-7}$ molar. Auf das Auge geschätzt dürfte durch diese rechnerische Vereinfachung kein allzu großer Fehler in der Bestimmung des toxischen Schwellenwertes eingetreten sein.

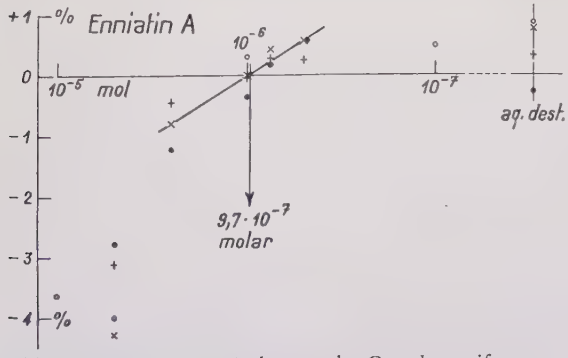



Abb. 9. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen von Enniatin A im Konzentrationsbereich von $2.5 \cdot 10^{-6}$ bis $5.0 \cdot 10^{-7}$ molar

Im Randentest (Abb. 10) liegt die Schwelle der toxischen Konzentration bei $5 \cdot 10^{-7}$ molar.

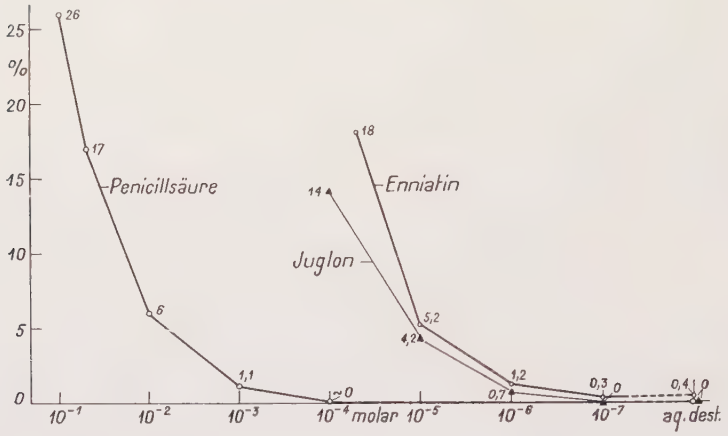



Abb. 10. Die Giftigkeit einiger Welketoxine und Antibiotica für Randengewebe. (Nach den Zahlen von Gäumann und von Arx, 1947)

## § 4. Alternariasäure

Über dieses Welketoxin haben vor kurzem Brian, Curtis, Hemming, Jefferys, Unwin und Wright (1951), Wright (1951) und, in dieser Zeitschrift, Gäumann, Kern und Sauthoff (1952) berichtet.

Die dosis minima für die Auslösung von Nekrosen in der Intensität von 1.5 bei Tomatensprossen liegt bei der Alternariasäure außerordentlich niedrig, nämlich bei 220 Gamma je kg Lebendgewicht; Alternariasäure ist somit das stärkste Welkegift, das wir zur Zeit kennen. Im Gegensatz dazu liegt der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten (Abb. 11) in einem mittleren Bereich, nämlich bei $4.9 \cdot 10^{-4}$ molar. Für Randengewebe ist sie unwirksam.

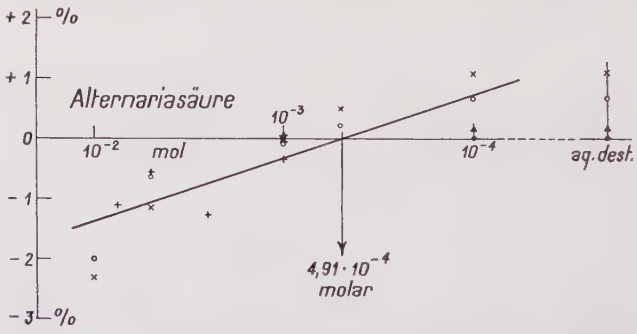



Abb. 11. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen der Alternariasäure im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-4}$ molar

## § 5. Patulin

Patulin (Clavacin, Claviformin, Expansin, Tercinin) wird u. a. durch *Aspergillus clavatus* Desm., *Penicillium expansum* Link, *Penicillium patulum* Bain. und *Penicillium urticae* Bain. gebildet. Es ist chemisch ein ungesättigtes Lakton von der Bruttoformel $C_7H_6O_4$ und dem Molekulargewicht 154.1 (z. B. Birkinshaw, Bracker, Michael und Raistrick, 1943; Brzeski, 1949; Engel, Brzeski und Plattner, 1949). Über seine pflanzenpathogenen Eigenschaften

haben u. a. Gäumann und Jaag (1947), Miescher (1950), Gäumann (1951), Seiler (1951) und Reusser (1952) berichtet, über seine Giftwirkung bei tierischen Objekten u. a. Jirovec (1949). Wahrscheinlich gehen auch die Schädigungen an Weizenblättern durch ein nicht näher definiertes Penicillium, über die Noll (1949) berichtet, auf die Einwirkung von Patulin (oder Citrinin) zurück.

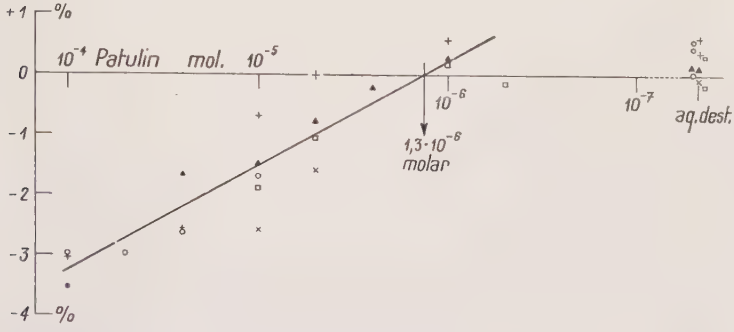



Abb. 12. Die Längenveränderung von Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Patulin-Lösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-4}$ bis $10^{-6}$ molar

Patulin ist ein starkes, unspezifisches Plasmagift mit einem weiten Wirtsspektrum; wir kennen noch keine Blütenpflanze, die durch Patulin nicht zum Welken gebracht worden wäre. Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an den Stengeln, Blattstielen und Blättern von Tomatensprossen liegt bei 20 mg je kg Lebendgewicht (Miescher, 1950). Der Schwellenwert im Randentest liegt bei einer Konzentration von $10^{-4}$ molar, der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten bei der Konzentration von $1.3 \cdot 10^{-6}$ molar (Abb. 12).

## 3. Kapitel

## Versuche mit Antibiotica

Die Scheidung der biogenen Toxine in Welketoxine (die wir im vorangehenden Kapitel besprochen haben) und in Antibiotica (die uns im vorliegenden Kapitel kurz beschäftigen werden), beruht ausschließlich auf praktischen Erwägungen.

Die Welketoxine werden von pflanzenpathogenen Mikroorganismen, vorwiegend durch Erreger von Welkekrankheiten, gebildet; ihre charakteristische Wirksamkeit richtet sich dementsprechend gegen Blütenpflanzen, insbesondere gegen den spezifischen Wirt des betreffenden Krankheitserregers. Doch sind die meisten von ihnen (eine Ausnahme bildet das Lycomarasmin) auch gegen bestimmte Mikroorganismen wirksam.

Die Antibiotica werden dagegen vorwiegend von saprophytischen Mikroorganismen gebildet; ihre charakteristische Wirksamkeit richtet sich u. a. gegen humanpathogene Mikroorganismen. Doch wirken einige von ihnen auch toxisch auf gewisse Blütenpflanzen (Gäu-

mann, Jaag und Braun, 1947; Gäumann und von Arx, 1947). Wir erweitern deshalb im vorliegenden Kapitel unsere früheren Messungen über die Toxizität der Antibiotica um einige weitere Beispiele. Es liegt in der Natur der Sache, daß wir sie ohne inneren Zusammenhang aufzählen.

## § 1. Penicillin G

Die Penicilline werden hauptsächlich durch Penicillien der *chrysogenum-notatum*-Gruppe gebildet; sie kennzeichnen sich durch eine eigenartige Verknüpfung eines Laktam- und eines Thiazolidinringes. Wir verwendeten das Natriumsalz des Penicillins G (Benzyl-Penicillin) von Pfizer mit einem Molekulargewicht von 334.

Die dosis minima des Penicillins G für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen liegt bei 580 mg je kg Lebendgewicht; die Nekrosen folgen dabei dem Lycomarasmintypus und treten sowohl an den Spitzen und Rändern der Fiederblättchen als in den Interkostalfeldern auf. Die Stengel werden dagegen nicht in Mitleidenschaft gezogen.

Penicillin G schädigt in den Grundgeweben von Tomatenblättern die Permeabilitätsverhältnisse nicht; Abb. 13 zeigt, daß es auch in einer Konzentration von $1.69 \cdot 10^{-2}$ molar, d. h. im unmittelbaren Bereich einer Konzentration, die physikalisch (osmotisch) zu wirken beginnt (Abb. 4), noch keine Störungen der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten auslöst. Auch für Randengewebe ist es völlig ungiftig.

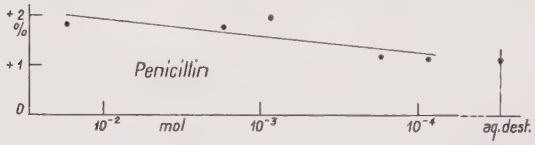



Abb. 13. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen von Penicillin G im Konzentrationsbereich von $1.69 \cdot 10^{-2}$ bis $8.45 \cdot 10^{-5}$ molar

Man fragt sich, wie es möglich sei, daß Penicillin G schon bei Verabreichung eines halben Grammes je kg Lebendgewicht deutliche Nekrosen an Tomatensprossen hervorruft, während es sich anderseits für die Protoplasten derselben Gewebe im Gewebestreifentest als unschädlich erweist. Der Grund liegt offenbar darin, daß das Penicillin bei der artifiziellen Einführung in das Innere der Tomatensprosse auf enzymatischem Wege zersetzt wird und daß seine Spaltprodukte den an Tomatensprossen zu beobachtenden phytotoxischen Effekt hervorrufen.

## § 2. Penicillsäure

Penicillsäure wird von mehreren Penicillien, unter ihnen *Penicillium puberulum* Bain. und *Penicillium cyclopium* Westl., gebildet und ist chemisch ein ungesättigtes Lakton von der Bruttoformel $C_8H_{10}O_4$ und dem Molekulargewicht 170.

Das Welkebild der Penicillsäure bei jungen Tomatensprossen folgt dem Patulintypus mit starker Stengelwirkung; am Stengel treten schon bei einer mittleren Giftdosis längliche, dunkle, einfallende Nekrosen auf, die auf die Blattstiele übergreifen und leicht zu Knickungen (ähnlich wie sie in Abb. 20

und 21 für Dithan D-14 dargestellt wurden) führen. Bei den Fiederblättchen erfolgen nekrotische Schädigungen sowohl am Rand als in den Interkostalfeldern; sie sind groß und unregelmäßig.

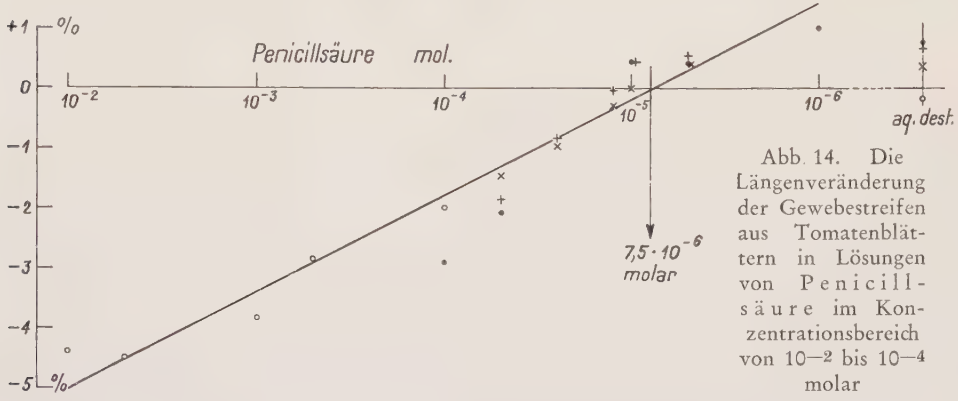



Abb. 14. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen von Penicillsäure im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-4}$ molar

Die dosis minima für die Schädigungsintensität 1.5 liegt bei 110 mg je kg Lebendgewicht. Im Gegensatz zum Penicillin schädigt die Penicillsäure die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von Tomatenblättern in hohem Grade; der Schwellenwert liegt in Abb. 14 bei der Konzentration von $7.5 \cdot 10^{-6}$ molar. Auch für Randengewebe besitzt Penicillsäure eine gewisse Giftigkeit; der Schwellenwert liegt zwischen $10^{-4}$ und $10^{-3}$ molar (Abb. 10).

## § 3. Kojisäure

Kojisäure wird unter anderem durch zahlreiche *Aspergillus*-Arten, z. B. durch *Aspergillus oryzae* (Ahlb.) Cohn, gebildet; sie ist chemisch ein $\gamma$-Pyron mit der Bruttoformel $C_6H_6O_4$ und dem Molekulargewicht 142.

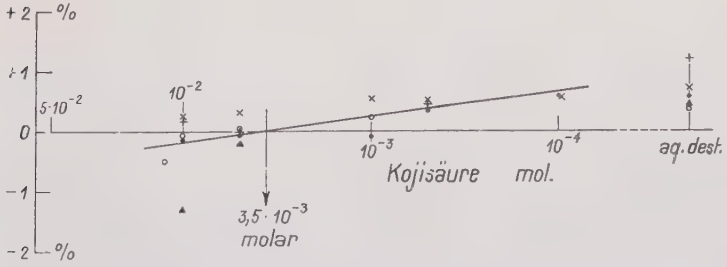



Abb. 15. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen von Kojisäure im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-4}$ molar

Das Welkebild der Kojisäure bei Tomatensprossen folgt dem Lycomarasmintypus; bei sehr hohen Dosen (3100 mg je kg Lebendgewicht) treten zudem leichte Schädigungen an den Blattstielen auf, vor allem ein Schlaffwerden und Zusammenschrumpfen. Kojisäure ist somit bei direkter Aufnahme für Tomatensprosse ungiftig. Auch ihre schädigende Wirkung auf die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten der Tomatenblätter ist gering; der Schwellenwert liegt in Abb. 15 bei der Konzentration von $3.5 \cdot 10^{-3}$ molar. Kojisäure vermag die Semipermeabilität der Randengewebe nicht zu schädigen.

## § 4. Streptomycin

Streptomycin wird durch *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waks. gebildet und ist chemisch ein Glykosid eines Disaccharids von der Bruttoformel $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ und dem Molekulargewicht 581. Wir verwendeten das Streptomycinsulfat von Pfizer.

Das Welkebild des Streptomycins bei jungen Tomatensprossen folgt dem Lycomarasmintypus. Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen liegt sehr hoch, nämlich bei 680 mg je kg Lebendgewicht (Abb. 2). Streptomycin schädigt dagegen die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von Tomatenblättern in hohem Grade; der Schwellenwert liegt in Abb. 16 bei der Konzentration von $7.5 \cdot 10^{-6}$ molar; dagegen ist Streptomycin für Randengewebe vollkommen ungiftig und auch in der Konzentration von $6.8 \cdot 10^{-2}$ molar noch unwirksam.

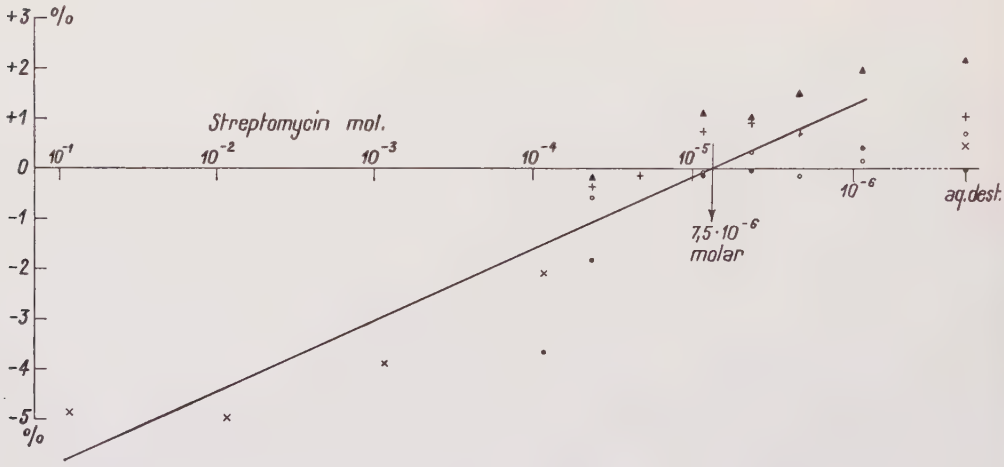



Abb. 16. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Streptomycin-Lösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-1}$ bis $10^{-6}$ molar

## § 5. Aureomycin

Aureomycin wird von *Streptomyces aureofaciens* Dugg. gebildet und ist chemisch eine Base von der ungefähren Bruttoformel $C_{22}H_{27-29}O_8N_2Cl$ und dem ungefähren Molekulargewicht 483. Wir verwendeten das Aureomycin-Hydrochlorid von Lederle, gepuffert mit Natriumglycinat; dieses letztere ist für Tomatengewebe noch in der Konzentration von $10^{-1}$ molar ungiftig und wurde deshalb bei der Kalkulation unserer Lösungen als bloßer Ballast außer Berechnung gelassen. Da Aureomycin unter Umständen rasch inaktiviert wird, überwachten wir seine Aktivität während der Versuche stets an Hand des *subtilis*-Plattentestes.

Das Krankheitsbild des Aureomycins bei Tomatensprossen deckt sich im wesentlichen mit demjenigen des Lycomarasmins. Die dosis minima für die

Auslösung bestimmter Nekrosen liegt bei 220 mg je kg Lebendgewicht (Abbildung 2). Aureomycin schädigt auch die Permeabilität der Protoplasten aus Tomatenblättern in verhältnismäßig hohen Verdünnungen; der Schwellenwert liegt in Abb. 17 bei der Konzentration von $1.7 \cdot 10^{-5}$ molar. Das Verhalten gegenüber Randengewebe konnte wegen der störenden Einwirkung der Eigenfarbe der Aureomycinlösungen nicht mit genügender Genauigkeit geprüft werden.

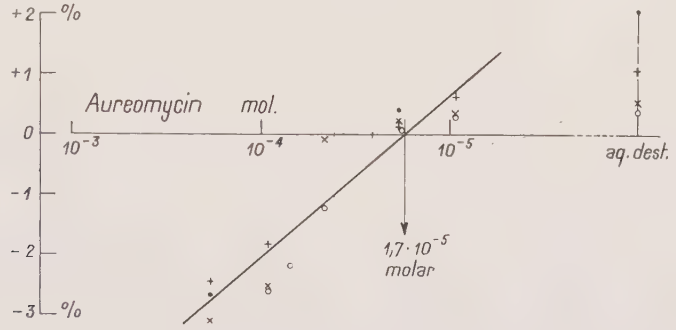



Abb. 17. Die Längenveränderung der Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Aureomycin-Lösungen im Konzentrationsbereich von $10^{-3}$ bis $10^{-5}$ molar

## § 6. Chloromycetin

Chloromycetin wird von *Streptomyces venezuelae* Ehrl. gebildet. Seiner chemischen Zusammensetzung nach ist es Dichloracetamidonitrophenylpropandiol; doch läßt es sich für den Zweck der vorliegenden Arbeit nicht ohne weiteres einer bestimmten Stoffgruppe zuweisen; seine Bruttoformel lautet $C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$; das Molekulargewicht beträgt 323.

Das Krankheitsbild an Tomatensprossen folgt dem Lycomarasmintypus. Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen beträgt rund 160 mg. Die Störungsgrenze für die Wasserpermeabilität der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bei der Konzentration von $1.3 \cdot 10^{-3}$ molar (Abbildung 18). Für Randengewebe ist Chloromycetin innerhalb vernünftiger Konzentrationen unwirksam.

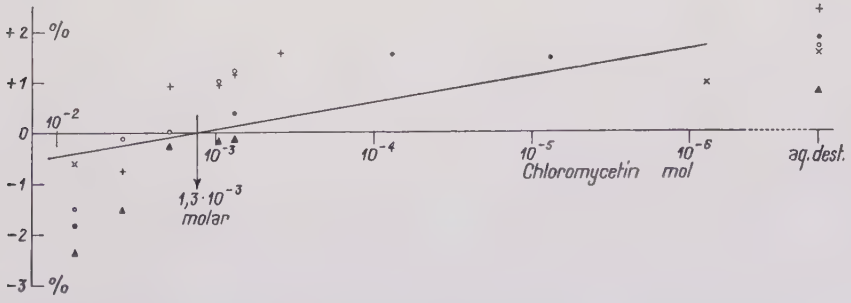



Abb. 18. Die Längenveränderung von Gewebestreifen aus Tomatenblättern in Lösungen von Chloromycetin im Konzentrationsbereich von $10^{-2}$ bis $10^{-6}$ molar

## 4. Kapitel

## Versuche mit oberflächenaktiven Stoffen

In den beiden vorangehenden Kapiteln wurde ein gewisses Tatsachenmaterial zusammengetragen zur Beantwortung der Frage, ob eine Beziehung bestehe zwischen der summarischen Giftigkeit eines Welketoxines einerseits (gemessen an Hand der dosis minima) und der Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten anderseits (gemessen an Hand der Störung ihrer Permeabilität). Im vorliegenden Kapitel möchten wir dieselbe Fragestellung an Hand einiger Benetzungsmittel durcharbeiten: Wie verhält sich bei oberflächenaktiven Stoffen die allgemeine Toxizität für Tomatensprosse einerseits zur Schädigung der osmotischen Eigenschaften der betreffenden Protoplasten anderseits?

Als Modellsubstanzen kommen nur solche Benetzungsmittel in Frage, die an sich für pflanzliche Objekte möglichst wenig giftig sind, damit der eventuell auftretende Störungseffekt vorwiegend durch Vorgänge an oder in der Plasmagrenzschicht ausgelöst wird. Dieses Problem ist bereits durch Mirimanoff, 1949; Mirimanoff und Bolle, 1949; Bolle und Mirimanoff, 1950; Engler, 1950; Engler und Mirimanoff, 1951, behandelt worden. Herr Kollege Mirimanoff hat uns bei der Wahl der Modellsubstanzen in freundlicher Weise beraten.

Wir besprechen zwei Beispiele von nichtionisierten Benetzungsmitteln (Carbowaxe und Tweens) und hernach ein Pflanzenschutzmittel mit starken oberflächenaktiven Eigenschaften (Dithan).

### § 1. Carbowax 1500 und 4000

Carbowaxe sind Polyäthylenglykole mit Molekulargewichten über 1000. Hodgson, Peterson und Riker (1949) haben bereits ihre pathogene Wirkung auf Tomatensprosse untersucht und festgestellt, daß sie bis zur Molekulargröße von 9000 ungefähr linear mit der Molekulargröße zunimmt.

Für die vorliegende Arbeit verwendeten wir die Molekulargewichtsstufen 1500 und 4000, die uns von der Union Carbide and Carbon Corporation in New York zur Verfügung gestellt wurden.

Einige Versuche über die Schadwirkung der beiden Carbowaxe auf junge Tomatensprosse sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Das Schädigungsbild folgt im allgemeinen dem Lycomarasmintypus. Die dosis minima (Wirkungsstufe 1.5 nach 48 Stunden) beträgt bei Carbowax 1500 7000 mg je kg Lebendgewicht, bei Carbowax 4000 bloß noch 1000 mg. Es bestätigt sich somit die Erfahrung von Hodgson, Peterson und Riker, wonach die Toxizität der Carbowaxe mit dem Molekulargewicht steil zunimmt. Anderseits liegen die kritischen Mengen von 7000 bzw. von 1000 mg in derselben Größenordnung wie bei Inulin, also einem chemisch inerten Polysaccharid, für das Gäumann und Jaag (1950) als Modellsubstanz eine dosis minima von rund 1600 mg je kg Lebendgewicht festgestellt haben.

Die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern (Gewebestreifentest) werden durch die beiden Carbowaxe nicht verändert; dadurch bestätigt sich die Auffassung, daß diese beiden Substanzen ihren Welke-Effekt rein mechanisch durch eine Verstopfung der submikroskopischen Wasserleitungsbahnen zuwegebringen. Auch für Randengewebe sind die beiden Carbowaxe unwirksam.

*Tabelle 2*

Die pathogene Wirkung der untersuchten Carbowaxe und Tweens auf junge Tomatensprosse

| Präparat | Molekulargewicht | Konzentration molar | Verabreichte Dosis in mg je kg Lebendgewicht | Wirkung nach 48 Stunden | Dosis minima (Wirkungsstufe 1.5 nach 48 Stunden) mg |
|---|---|---|---|---|---|
| Carbowax 1500 | 1500 | $2 \cdot 10^{-3}$ | 7500 | 1.53 | 7000 |
| | | | 3750 | 1.18 | |
| | | | 1875 | 1.05 | |
| Carbowax 4000 | 4000 | $10^{-2}$ | 10000 | 3.47 | 1000 |
| | | | 5000 | 2.78 | |
| | | | 2500 | 2.23 | |
| Tween 20 | 1225 | $6 \cdot 10^{-3}$ | 1600 | 2.83 | 500 |
| | | | 800 | 2.48 | |
| | | | 400 | 1.13 | |
| Tween 80 | 1310 | $6 \cdot 10^{-3}$ | 2000 | 4.00 | 250 |
| | | | 1000 | 3.50 | |
| | | | 500 | 2.13 | |

## § 2. Tween 20 und 80

Die Atlas Tweens bestehen aus einer Reihe von Polyoxyalkylenderivaten von Hexitanhydriden, deren Hydroxylgruppen teilweise mit langkettigen Fettsäuren verestert sind. Die sechswertigen Alkohole Mannit und Sorbit bilden die Ausgangsprodukte. Der asymmetrische Charakter dieser Alkohole, insbesondere des Sorbits, erlaubt die Herstellung verschiedener isomerer Anhydride. So ist es möglich, bei gleichem Veresterungsgrad von den Esterderivaten Mischungen herzustellen, die gegenüber den einfachen Derivaten überlegene Eigenschaften besitzen.

Die Tweens sind Nichtelektrolyte und enthalten praktisch gesprochen keine Seifen, keine freien Fettsäuren und keine anorganischen Salze. Tween 20 ist ein Sorbitan-monolaurat-polyoxyalkylen-Derivat mit einem Molekulargewicht von etwa 1225; Tween 80 ist ein Sorbitan-monooleat-polyoxyalkylen-Derivat mit einem Molekulargewicht von etwa 1310.

Im Gegensatz zu den beiden Carbowaxen, die sich als chemisch weitgehend inert erwiesen haben, ist die summarische Giftigkeit der beiden Tweens für junge Tomatensprosse überraschend groß. Die Schädigungssymptome folgen bei beiden dem Lycomarasmintypus (reine Blattsymptome); nur bei Tween 80 wird gelegentlich ein Blattstiel schlaff.

Die für die Auslösung der Schädigungsstufe 1.5 notwendige Dosis beträgt bei Tween 20 rund 500 mg je kg Lebendgewicht, bei Tween 80 rund 250 mg; sie ist also größenordnungsmäßig nur um eine Zehnerpotenz kleiner als beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex, beim Patulin usw. Und anderseits ist die Toxizität der beiden Tweens rund zehn- bis zwanzigmal größer als diejenige von Carbowax 1500, das ja ein ähnliches Molekulargewicht besitzt.

Der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften von Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bei Tween 20 im Bereiche der Konzentration von $1.2 \cdot 10^{-5}$ molar, bei Tween 80 bei $2.7 \cdot 10^{-3}$ molar. Der Wert für Tween 20 ist nur näherungsweise richtig, da sich die Meßpunkte nicht geradlinig anordnen; die Regressionsgerade ist deshalb mit einem erheblichen Fehler belastet. Auf das Auge hin zu urteilen, würde die Wirkungsschwelle eher zwischen den Konzentrationen von $10^{-4}$ und $5 \cdot 10^{-5}$ molar liegen. — Für Randengewebe sind beide Tweens unwirksam.

Es wird gelegentlich zu prüfen sein, ob Spuren von Seifen oder von freien Ölsäuren, die in den handelsüblichen Tweens vorhanden sein mögen, den verhältnismäßig starken toxischen Effekt der Tweens mitbedingen helfen; doch reicht diese Frage über den Rahmen der vorliegenden Arbeit hinaus.

### § 3. Dithan

Dithan ist chemisch Dinatrium-äthylen-bisthiocarbamat mit der Bruttoformel $C_4H_6N_2Na_2S_4$ und dem Molekulargewicht 256. Es ist nicht primär ein echtes Benetzungsmittel, sondern besitzt bloß eine größere Oberflächenaktivität und infolgedessen eine größere Benetzungsfähigkeit als die üblichen Pflanzenschutzmittel. Da es auf die Sporen von *Diplocarpon, Sphaerotheca, Venturia, Cercospora* usw. toxisch wirkt, wurde es von Dimond, Heuberger und Horsfall (1943) als Pflanzenschutzmittel vorgeschlagen und seither durch Tisdale und Flenner (1951) weiterentwickelt. Wir verwendeten das Präparat Dithan D-14, ein Dithanhexahydrat mit dem Molekulargewicht 364, das uns von der Rohm und Haas Co. in Philadelphia in freudlicher Weise zur Verfügung gestellt wurde.

Abb. 19. Blattsymptome an jungen Tomatensprossen, ausgelöst durch Dithan D-14. ½ nat. Gr.

Dithan D-14 ruft bei jungen Tomatensprossen eigenartige Krankheitsbilder hervor. Die Blatt-

ränder, später die Blattspreiten zeigen große glänzende Nekrosen von grauer Farbe (Abb. 19) und rollen sich später ein und werden dürr. An den Blattstielen und am Stengel entstehen längliche bräunliche Nekrosen (ähnlich wie unter der Einwirkung von Penicillsäure), die stark einsinken, bis die Blattstiele bzw. der Stengel an einer oder mehreren Stellen scharf begrenzt bis auf Fadenstärke eingeschrumpft sind (Abb. 20 und 21). Bei starken Blattsymptomen treten in der Regel schwache Stengelsymptome auf und umgekehrt.

Es wird in späterer Zeit ein reizvolles Studienobjekt sein, diese besondere Art der Lokalisierung des toxischen Effektes auf kurze Einschnürungsstrecken näher zu ergründen.

Was das Ausmaß der Toxizität des Dithan D-14 betrifft, so ist die Bonitierung sehr schwierig durchzuführen, weil einerseits die örtlich beschränkten und für das Schicksal der Pflanzen doch ausschlaggebenden Einschnürungen an den Stengeln sprunghaft auftreten, und weil anderseits starke Stengelsymptome mit schwachen Blattsymptomen vergesellschaftet sind und umgekehrt. Dithan D-14 gibt deshalb keine ausgeglichenen Zahlenreihen. Tabelle 3, in der wir willkürliche eine Versuchsreihe herausgegriffen haben, mag diese Unebenheiten illustrieren. Im groben Mittel beträgt die kritische Dosis für die Auslösung der Schädigungsstufe 1.5 bei Dithan D-14 rund 450 mg je kg Lebendgewicht; sie bewegt sich also in einer ähnlichen Größenordnung wie bei den beiden Tweens.

Abb. 20. Junger Tomatensproß, bei dem durch Dithan D-14 schwache Blattsymptome (links) und eine Einschnürungsstelle am am Stengel ausgelöst wurden. ½ nat. Gr.

Abb. 21. Junger Tomatensproß, bei dem durch Dithan D-14 schwache Blattsymptome (rechts) und drei Einschnürungsstellen am Stengel ausgelöst wurden. ½ nat. Gr.

Für die Protoplasten aus Tomatenblättern (Gewebestreifentest) ist Dithan D-14 äußerst giftig; die Wirkungsschwelle liegt bei der Konzentration von $6.7 \cdot 10^{-7}$ molar. Auch für Randengewebe ist Dithan ein starkes Gift; der Schwellenwert für den Austritt des Anthocyans liegt bei der Konzentration von $7.4 \cdot 10^{-5}$ molar.

*Tabelle 3*

Die pathogene Wirkung von Dithan D-14 auf junge Tomatensprosse

| Konzentration molar | Verabreichte Dosis in mg je kg Lebendgewicht | Wirkung nach 48 Stunden | | | Dosis minima (Wirkungsstufe 1.5 nach 48 Stunden) mg |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Blätter | Stengel | Mittel | |
| $5.10^{-3}$ | 320 | 0.90 | 1.63 | 1.27 | etwa 450 |
| $2.10^{-3}$ | 128 | 0.75 | 1.93 | 1.34 | |
| „ | 64 | 0.87 | 0.78 | 0.83 | |
| „ | 32 | 0.57 | 0.93 | 0.75 | |

## 5. Kapitel

## Allgemeine Betrachtungen

Die wichtigeren Ergebnisse der drei vorangehenden Kapitel sind in Tabelle 4 zusammengestellt. Die Zuweisung der verschiedenen Substanzen in bestimmte Stoffgruppen mußte naturgemäß etwas willkürlich geschehen; sie erfolgte auf Grund der Erwägung, welche chemische Eigenschaft der betreffenden Verbindung im vorliegenden Zusammenhang für sie charakteristisch sei; bei Chloromycetin mußte sie gänzlich unterbleiben.

### § 1. Die systematische Stellung der Toxinbildner

Die Pilze, welche die in Tabelle 4 besprochenen echten Welketoxine produzieren, gehören in systematischer Beziehung sämtlich zu den Ascomyceten. Lycomarasmin, Fusarinsäure und Enniatin werden von Fusarien gebildet, also von Vertretern der Hypocreaceen; der Produzent von Alternariasäure ist *Alternaria solani*, die wahrscheinlich als Nebenfruchtform in den Entwicklungsgang einer Pseudosphaeriacee gehört; und Patulin wird von Penicillien gebildet, also von Vertretern der Aspergillaceen. Diese Einseitigkeit, daß in unserer Tabelle bloß Ascomyceten als Toxinbildner erscheinen, hat keinen tieferen Sinn, sondern beruht bloß auf dem Zufall, daß bis jetzt nur aus dieser Pilzgruppe pflanzenpathogene Welketoxine chemisch rein isoliert worden sind; daneben werden jedoch andere Welketoxine wahrscheinlich auch von Phycomyceten (z. B. *Pythium*) gebildet, ferner von Basidiomyceten (z. B. *Stereum purpureum*) und möglicherweise auch von einigen pflanzenpathogenen Bakterien. Das Bild der pilzlichen Toxinproduzenten wird sich also in einigen Jahren erheblich ausgeglichener gestalten.

*Tabelle 4* Die Toxizität einiger Welketoxine (Marasmine) und einiger Antibiotica und Modellsubstanzen für pflanzliche Objekte

| Gift | chemische Natur | Bruttoformel | Molekulargewicht | dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen mg je kg Frischgewicht | Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten v. Tomatenblättern molar | Schwellenwert für die Zerstörung der Semipermeabilität der Gewebe von roten Randen molar |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ***Welketoxine*** | | | | | | |
| Reines Lycomarasmin | Dipeptid (?) | $C_9H_{15}O_7N_3$ | 277 | 150 | $1.2 \cdot 10^{-2}$ | unwirksam |
| Lycomarasmin-Eisen-Komplex | — | — | 330 | 15 | $9.0 \cdot 10^{-4}$ | unwirksam |
| Reine Fusarinsäure | Pyridinkarbonsäure | $C_{10}H_{13}O_2N$ | 179 | 158 | $2.8 \cdot 10^{-5}$ | $10^{-3}$ |
| Enniatin A | zyklisches Tetrapeptoid | $C_{24}H_{42}O_6N_2$ | 455 | 15 | $9.7 \cdot 10^{-7}$ | $5 \cdot 10^{-7}$ |
| Alternariasäure | ? | $C_{21}H_{30}O_8$ | 410 | 0,22 | $4.9 \cdot 10^{-4}$ | unwirksam |
| Patulin | ungesättigtes Lakton | $C_7H_6O_4$ | 154 | 20 | $1.3 \cdot 10^{-6}$ | $10^{-4}$ |
| ***Antibiotica*** | | | | | | |
| Penicillin G | $\beta$-Laktam, Thiazolidin | $C_{16}H_{18}O_4N_2S$ | 334 | 580 | $> 1.7 \cdot 10^{-2}$ | unwirksam |
| Penicillsäure | ungesättigtes Lakton | $C_8H_{10}O_4$ | 170 | 110 | $7.5 \cdot 10^{-6}$ | $5 \cdot 10^{-4}$ |
| Kojisäure | $\gamma$-Pyron | $C_6H_6O_4$ | 142 | 3100 | $3.5 \cdot 10^{-3}$ | unwirksam |
| Streptomycin | $\alpha$-Glykosid eines Disaccharids | $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$ | 581 | 680 | $7.5 \cdot 10^{-6}$ | unwirksam |
| Aureomycin | ? | $C_{22}H_{27\text{-}29}O_8N_2Cl$ | 483 | 220 | $1.7 \cdot 10^{-5}$ | —*) |
| Chloromycetin | ? | $C_{11}H_{12}O_5N_2Cl_2$ | 323 | 160 | $1.3 \cdot 10^{-3}$ | unwirksam |
| ***Oberflächenaktive Stoffe (Benetzungsmittel)*** | | | | | | |
| Carbowax 1500 | Polyäthylenglykol | — | etwa 1500 | 7000 | unwirksam | unwirksam |
| Carbowax 4000 | Polyäthylenglykol | — | etwa 4000 | 1000 | unwirksam | unwirksam |
| Tween 20 | Sorbit-monolaurat | — | etwa 1225 | 500 | $1.2 \cdot 10^{-5}$ | unwirksam |
| Tween 80 | Sorbit-monooleat | — | etwa 1310 | 250 | $2.7 \cdot 10^{-3}$ | unwirksam |
| Dithan D-14 | Bisthiocarbamat | $C_4H_6N_2Na_2S_4$ | 256 | etwa 450 | $6.7 \cdot 10^{-7}$ | $7.4 \cdot 10^{-5}$ |
| ***Mechanisch wirkende Welkeagentien*** | | | | | | |
| Inulin | Polysaccharid | $(C_6H_{10}O_5)$ x | etwa 5000 | 1600 | unwirksam | unwirksam |

*) Wegen der Eigenfarbe der Lösung nicht genau bestimmbar.

Bei den in Tabelle 4 besprochenen Antibiotica gehören die Produzenten zwei sich völlig fremden Gruppen von Mikroorganismen an: Penicillin, Penicillsäure und Kojisäure werden von Aspergillaceen, also von Ascomyceten, gebildet, Streptomycin, Aureomycin und Chloromycetin von *Streptomyces*-Arten, also von Actinomyceten.

Die als oberflächenaktive Stoffe ausgewählten Beispiele gehören endlich in die Gruppe der nichtionisierten Benetzungsmittel.

### § 2. Die chemische Natur der untersuchten Toxine

Die untersuchten echten Welketoxine gehören chemisch ganz verschiedenartigen Stoffgruppen an und lassen weder eine Beziehung zur systematischen Stellung des Erregers, der sie bildete, noch eine Beziehung zum spezifischen Wirt des betreffenden Erregers erkennen. Daß keine Beziehung zwischen der chemischen Natur der verschiedenen Toxine und der systematischen Stellung des sie bildenden Erregers bestehen kann, erhellt schon aus dem Beispiel des *Fusarium lycopersici*, das zu gleicher Zeit und nebeneinander zwei ganz verschiedenartige Toxine, einerseits das Lycomarasmin (ein Dipeptid) und anderseits die Fusarinsäure (eine Pyridinkarbonsäure) produziert. Und daß keine unmittelbare Beziehung zwischen der chemischen Natur der verschiedenen Toxine und dem spezifischen Hauptwirt des sie bildenden Erregers bestehen kann, geht aus dem Beispiel des Lycomarasmins und des Enniatins hervor, die beide zu der Gruppe der Polypeptide im weiten Sinne gehören, obschon das Lycomarasmin durch den Erreger einer Tomatenwelke, das Enniatin vorwiegend durch Erreger von Fußkrankheiten des Getreides gebildet wird.

In ähnlicher Weise sind bei den in Tabelle 4 besprochenen Antibiotica ganz verschiedenartige chemische Stoffgruppen vertreten, ohne daß sich zur Zeit zwischen ihnen irgendwelche tieferen Zusammenhänge erkennen ließen.

Den für die oberflächenaktive Gruppe ausgewählten Beispielen ist nur gemeinsam, daß sie die Oberflächenspannung des Wassers herabsetzen (Benetzungsmittel!). Im übrigen sind die Carbowaxe und die Tweens miteinander chemisch nicht näher verwandt.

Bei keiner der in Tabelle 4 zusammengestellten Stoffgruppen läßt sich somit irgendeine Beziehung zwischen dem chemischen Aufbau und der biologischen Wirkung erkennen.

### § 3. Das Molekulargewicht der untersuchten Toxine

Bei den echten Welketoxinen der Tabelle 4 schwankt das Molekulargewicht zwischen 154 (Patulin) und 455 (Enniatin A), bei den untersuchten Antibiotica zwischen 142 (Kojisäure) und 581 (Streptomycin). Zwei Dinge scheinen dabei wesentlich zu sein:

a) Die Kleinheit der Molekulargewichte der pflanzenpathogenen Toxine. Unter den humanpathogenen Toxinen besteht das Botulinustoxin aus 19 Aminosäuren; unter den pflanzenpatho-

genen Welketoxinen setzt sich das Enniatin A, das in der betreffenden Gruppe die größten Moleküle besitzt, bloß aus zwei Aminosäuren zusammen. Entsprechend dieser komplizierteren Struktur beträgt das Molekulargewicht des Diphtherietoxines rund 72 000, dasjenige des Botulinustoxines rund 900 000. Mit ihren Molekulargewichten zwischen 154 und 455 erreichen somit die echten Welketoxine nicht einmal 1 % des Molekulargewichtes der eben genannten humanpathogenen Toxine; dasselbe ist bei den untersuchten Antibiotica der Fall.

b) Die Ausgeglichenheit der Molekulargewichte der pflanzenpathogenen Toxine. Mit der Kleinheit der Molekel der pflanzlichen Welkegifte mag vielleicht zusammenhängen, daß ihre Molekulargewichte auffallend ausgeglichen sind; sie differieren nur um einige Hundert, während der Schwankungsbereich bei den zwei eben genannten humanpathogenen Toxinen rund 800 000 beträgt.

Diese Diskrepanzen können nicht auf einem Zufall beruhen. Sie lassen sich auch nicht durch die Annahme erklären, daß pathogene Bakterien ihrer Natur nach große, pathogene Pilze ihrer Natur nach kleine Toxinmolekel bilden; denn wir haben auf Grund von Tastversuchen Anlaß, zu vermuten, daß auch das Toxin eines bestimmten toxigenen pflanzenpathogenen Bakteriums kleine Molekel besitzt. Der Gegensatz — humanpathogene Toxine (große Molekel) — pflanzenpathogene Toxine (kleine Molekel) läßt sich somit nicht von der Erregerseite her erklären. Wir glauben vielmehr, daß die Ursache in der besonderen Struktur des pflanzlichen Wirtes, im Bau des pflanzlichen Körpers begründet liegt.

Damit ein pflanzenpathogenes Toxin im Innern der Wirtsgewebe überhaupt an die Oberfläche der Protoplasten herangelangen kann, muß es die Intermizellarräume des Zellulosegerüstes der Zellwände passieren. Dies scheint nur kleinen Molekeln zu gelingen; große Molekel werden durch die Zellulosewände mechanisch abgesiebt.

Man wird gegen diese Auffassung einwenden, daß die pflanzenpathogenen Viren große Molekel besitzen (Molekulargewichte in der Dimension $10^7$) und dennoch den gesamten pflanzlichen Körper überschwemmen. Nur liegen hier die Voraussetzungen anders. Es genügt bei manchen Viren, daß eine Molekel, d. h. ein Virusteilchen, durch die Plasmodesmen in das Innere der Nachbarzelle gelangt, um sich dort zu proliferieren und einen neuen Infektionsherd zu setzen. Bei den Welketoxinen müßten jedoch Millionen von Molekeln diesen Weg gehen, und das ist ihnen schon deshalb nicht möglich, weil sie ja wegen ihrer Koagulasewirkung die Plasmastruktur vor sich her zerstören und dadurch die Plasmodesmen selbst abdichten, d. h., sich ihren Weg durch die Plasmodesmen selbst verderben. Deshalb bleibt ihnen nur der Weg durch die Zellwände hindurch übrig, wie er durch den Saftstrom vorgezeichnet ist, und eben diesen Weg können große Toxinmolekel (nach unserer Auffassung) nicht gehen: Sie werden wegen ihrer Ausmaße einfach

physikalisch abfiltriert und kommen deshalb gar nicht an den Ort ihrer pathogenen Wirkung, an die Oberfläche der Protoplasten usw., heran.

Man wird ferner gegen die Filtertheorie einwenden, daß die am Fuß der Tabelle 4 als Modellsubstanzen geprüften Benetzungsmittel auch ganz respektable Welketoxine darstellen; denn die dosis minima, um bestimmte Schädigungen hervorzurufen, beträgt bei ihnen in günstigen Fällen etwa 1000 mg je kg Lebendgewicht. In dem betreffenden Beispiel liegt jedoch das Molekulargewicht bei 4000; also bestehe von dieser Seite her kein Grund, daß sie weiter oben in der Tabelle sämtlich unter 600 liegen müßten. Und sodann haben in der Tat Hodgson, Riker und Peterson (1945, 1947) und Hodgson, Peterson und Riker (1947) gezeigt, daß biogene Schleime, ferner hochmolekulare Substanzen wie Inulin (Molekulargewicht etwa 5000) und Polyvinylalkohole mit Molekulargewichten bis 5200 durch den Saftstrom bis weit in die Interkostalfelder der Blattspreiten hinaus verfrachtet werden können und dort charakteristische Welke-Effekte hervorrufen.

Nur kommt eben (nach unserer Auffassung) dieser pathogene Effekt auf einer ganz anderen Grundlage zustande als der Welke-Effekt der echten Welketoxine. Die Glukosane von Hodgson, Riker und Peterson wirken nicht unmittelbar toxisch; sie sind in einem chemischen Sinne ungiftig; sie sind ja auch zu einem großen Teil chemisch inert; sondern sie verstopfen bloß das Intermizellargerüst der Zellwände, machen es für Wasser unwegsam und drosseln dadurch die Wasseraufnahme und die Wasserabgabe der Gewebe in einem letalen Ausmaß (Gäumann und Jaag, 1950). Ihr Welke-Effekt ist also nicht chemischer, sondern mechanisch-physikalischer Natur.

Zweifelsohne könnten auch die großmolekligen echten Welketoxine (z. B. mit Molekulargewichten über 500) schlußendlich, wenn sie in hinreichender Menge vom Erreger ausgeschüttet würden, eine gewisse Verschlammung der Intermizellarräume zuwege bringen. Nur wird es praktisch kaum je so weit kommen; denn die dosis minima, um auf physikalischem Wege eine Abdichtung der Wasserwege hervorzurufen, beträgt, wie schon gesagt, in günstigen Fällen etwa 1000 mg je Kilogramm Lebendgewicht; bevor jedoch die Konzentration der für einen derartigen physikalisch-mechanischen Welke-Effekt in Frage kommenden echten Welketoxine in den Wirtspflanzen auf dieser physikalischen Wirkungsschwelle angelangt ist, haben die betreffenden Welketoxine aus chemischen Gründen die Wirtspflanzen längst ruiniert; denn der Schwellenwert für eine entscheidende chemische Schädigung der Wirtspflanzen liegt ja bei ihnen schon im Bereich von etwa 0,2 bis 15 mg je Kilogramm Lebendgewicht.

Wir glauben deshalb, die Ursache, warum die Toxinbildner unter den pflanzenpathogenen Krankheitserregern ihren Wirt nur durch kleine Toxinmolekel schädigen können, liege in der besonderen Struktur des pflanzlichen Wirtes begründet: große Molekel im Ausmaß der humanpathogenen Bakterientoxine werden mechanisch durch die Zellwände ab-

filtriert und gelangen deshalb gar nicht an den Ort der möglichen pathogenen Betätigung, sie gelangen nicht an die Oberfläche der Protoplasten (Selektion durch den Wirt).

### § 4. Das Wirkungsspektrum der untersuchten Toxine

Im vorliegenden Zusammenhang interessiert uns nicht die gesamte Breite der Wirkungsspektren der in Tabelle 4 besprochenen Welketoxine und Antibiotica, sondern nur das in Tabelle 4 ausgewiesene unterschiedliche Verhalten gegenüber Tomaten- und Randengeweben. Es lassen sich hier drei Möglichkeiten unterscheiden:

a) das betreffende Toxin ist für Tomaten- und für Randengewebe ungefähr gleichermaßen giftig. Dieser Fall trifft u. a. für das Enniatin A zu; seine dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen liegt niedrig, nämlich bei rund 15 mg je Kilogramm Lebendgewicht; in ähnlicher Weise liegt der Schwellenwert für den Austritt des Anthocyans aus den Randengeweben bei sehr starken Verdünnungen, nämlich bei der Konzentration von rund $5 \cdot 10^{-7}$ molar; bei diesem Toxin besteht somit keine besondere Prädilektion für Tomaten- bzw. für Randengewebe.

b) das betreffende Toxin ist für Tomatengewebe hochgradig giftig, für Randengewebe dagegen unwirksam. Eine derartige Spezifität für Tomatengewebe finden wir z. B. durch die Alternariasäure realisiert; sie ist äußerst giftig für Tomatengewebe, liegt doch die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen schon bei 220 $\gamma$ je Kilogramm Lebendgewicht; dagegen ist die Alternariasäure für Randengewebe ungiftig.

c) das betreffende Toxin ist für Tomatengewebe praktisch gesprochen ungiftig, besitzt dagegen eine gewisse Toxizität für Randengewebe. Dieser Fall liegt bei unserem Material noch nicht vor.

Die Frage nach den mutmaßlichen Ursachen dieser wirtsspezifischen Wirkung bzw. Nicht wirkung gewisser Welketoxine geht über den Rahmen der vorliegenden Untersuchung hinaus. Dennoch haben wir uns, um doch wenigstens ein erstes Bild über die Sachlage und über die methodischen Möglichkeiten ihrer Prüfung zu gewinnen, die Frage vorgelegt, warum z. B. Streptomycin für Randengewebe unwirksam sei. Die Wahl fiel auf dieses Antibioticum als Modellsubstanz, weil sich seine Anwesenheit im biologischen Test leicht nachweisen läßt.

Es bestehen hier drei Möglichkeiten:

a) daß das Streptomycin überhaupt nicht in das Innere der Randengewebe einzudringen vermag;

b) daß es im Innern der Randengewebe durch den Zellsaft inaktiviert wird, ähnlich wie dies bei einigen, industriell nicht verwendbaren Antibiotica z. B. durch das Blutserum geschieht; oder

c) daß es zwar in das Innere der Randengewebe eindringt und dort nicht desaktiviert wird, aber keine Schädigungen auslöst, weil es keine Angriffspunkte findet, also gewissermaßen keine Antigenwirkung besitzt.

Die hier zu besprechenden Versuche wurden von unserem Mitarbeiter Dr. Lukas Stalder durchgeführt.

## 1. Versuch

Versuchsfrage: Wird Streptomycin durch Randen-Preßsaft desaktiviert?

Im Filterscheibentest, wie ihn die Antibiotiker verwenden, wurden die folgenden Lösungen geprüft:

a) 1 ml konzentrierte Streptomycinlösung (0,1 mg auf 1 ml Wasser) + 1 ml dest. Wasser;

b) 1 ml Randen-Preßsaft + 1 ml dest. Wasser;

c) 1 ml Streptomycinlösung + 1 ml Randen-Preßsaft.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Sie zeigen, daß durch den Randen-Preßsaft keine Desaktivierung des Streptomycins stattfindet; die oben unter b) genannte Möglichkeit scheidet infolgedessen aus.

*Tabelle 5*

Das Zusammenwirken von Streptomycin mit Randenpreßsaft
Erklärung im Text

| Testorganismus | Gemisch a Hemmungszone in mm | Gemisch b Hemmungszone in mm | Gemisch c Hemmungszone in mm |
|---|---|---|---|
| *Bacillus megatherium* .... | 25 | 0 | 24 |
| *Bacillus subtilis* ..... | 31 | 0 | 31 |
| *Candida vulgaris* ..... | 0 | 0 | 0 |

## 2. Versuch

Versuchsfrage: Dringt das Streptomycin in das Innere der Randengewebe ein und bleibt es dort in aktiver Form vorhanden?

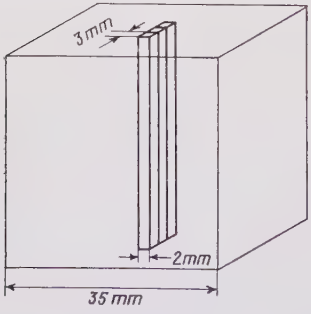



Abb. 22. Versuchsanordnung, um das Eindringen des Streptomycins in das Innere der Randengewebe zu verfolgen. Erklärung im Text

Aus Randenknollen wurden Würfel von 35 mm Kantenlänge herausgeschnitten und während 24 Stunden bei 3 ° C in eine Lösung von 5 mg Streptomycin je ml Wasser gelegt. Dann wurden die Würfel während fünf Minuten äußerlich unter strömendem Wasser gewaschen. Hernach wurden aus ihrem Innern nach Art der Abb. 22 streifenförmige Gewebesäulen von 3 mm Breite, 2 mm Dicke und 35 mm Länge herausgeschnitten auf *subtilis*-Platten gelegt und während 20 Stunden inkubiert.

Bei dieser Arbeitsweise besteht die Möglichkeit, daß das Messer beim Herausschneiden der Gewebesäulen von den Randpartien der Gewebewürfel her (die ja zweifelsohne auf jeden

Fall mehr Streptomycin enthalten als die Gewebe im Innern der Würfel) Streptomycin mitnimmt und auf diese Weise weiter unten die Oberfläche der Gewebestreifen kontaminiert. Daß diese „Vergiftung der Oberflächen" tatsächlich erfolgt, zeigt Abb. 23, in welcher die Gewebestreifen ohne weitere Zwischenbehandlung unmittelbar auf die *subtilis*-Platten ausgelegt wurden.

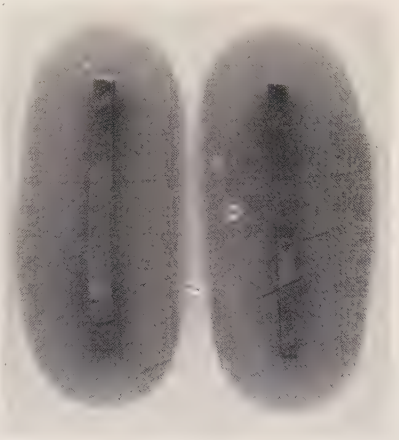


Abb. 23. Die Hemmungshöfe um die Gewebestreifen aus Randenwürfeln, wenn die Gewebestreifen keine oberflächliche Reinigung erfahren. Erklärung im Text. Nat. Gr.

Um dieses mechanisch verschleppte Streptomycin wieder zu eliminieren, wuschen wir in der Folgezeit die Gewebestreifen während einer Stunde unter strömendem Wasser aus; auf diese Weise wird, wie Kontrollversuche zeigten, sämtliches oberflächlich anhaftende Streptomycin wieder entfernt, und es gelangt beim *subtilis*-Platten-Test nur jenes Streptomycin zur Auswirkung, das während der Inkubation aus dem Innern der Zellen an die Oberfläche der Gewebestreifen und von da auf den Agar hinaus diffundiert ist.

Abb. 24 veranschaulicht die Art der Hemmungshöfe bei diesen ausgelaugten Gewebestreifen. Aus dem Innern der Gewebestreifen scheint während der Auslaugung nicht viel Streptomycin verlorengegangen zu sein; denn die Hemmungshöfe sind in Abb. 24 an der Stirnseite der Gewebestreifen fast ebenso breit geblieben wie in Abb. 23.

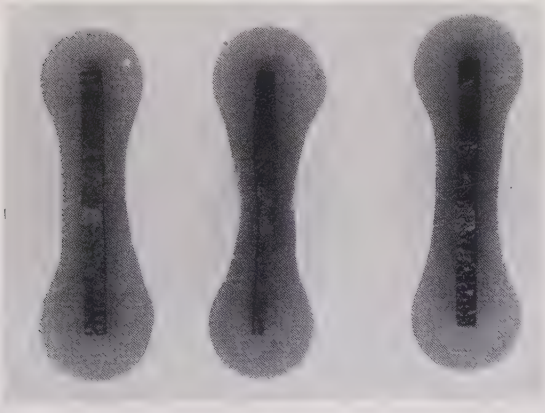


Abb. 24. Die Hemmungshöfe um die Gewebestreifen aus Randenwürfeln, wenn die Gewebestreifen während einer Stunde in strömendem Wasser ausgewaschen wurden.
Erklärung im Text. Nat. Gr.

Im übrigen lehrt die Abb. 24, daß das Streptomycin tatsächlich in das Innere der Randengewebe eingedrungen ist und dort in aktiver Form vorhanden bleibt. Wenn es also in den Randengeweben (im Gegensatz zu den Tomatenpflanzen) keine manifesten Schädigungen hervorruft, so muß dies darauf beruhen, daß es in den Randenzellen keine Angriffspunkte findet und deshalb von ihnen gleich einem inerten Ballaststoff toleriert wird.

### 3. Versuch

Versuchsfrage: In welchem Ausmaß sinkt in den Würfeln aus Randengewebe der Streptomycinspiegel von der Oberfläche gegen die Mitte der Würfel hin?

Ein quaderförmiges Randenstück von der Kantenlänge 35 × 35 × 70 mm wurde 24 Stunden in eine Lösung von 6,6 mg Streptomycin je ml Wasser gelegt. Dann wurde mit einem Korkbohrer von der Stirnseite her mitten durch den Quader hindurch ein Zylinder von 70 mm Länge und 6,5 mm Durchmesser herausgestanzt. In den in Tabelle 6 angeführten Abständen wurden aus diesem Zylinder Scheiben von 1 mm Dicke geschnitten, während drei Minuten in fließendem Wasser gewaschen und dann auf *subtilis*-Platten gelegt. Als Kontrolle dienten gleiche Randenscheiben, die in sechs Streptomycinlösungen von bekannten Konzentrationen (100 mg je ml bis 0,001 mg je ml) getaucht und ebenfalls gegen *Bacillus subtilis* getestet wurden. Die Durchmesser der entstandenen Hemmzonen wurden linear und die Streptomycinkonzentrationen logarithmisch aufgetragen; die Kurve verlief bei den mittleren Konzentrationen geradlinig. Aus dieser Kurve konnte an Hand der Hemmhofdurchmesser die Konzentration des eingedrungenen Streptomycins in den verschiedenenen Schichtproben bestimmt werden.

*Tabelle 6*

Das Diffusionsgefälle von Streptomycin im Innern von Randengeweben

Erklärung im Text

| Eindringtiefe mm | Durchmesser der Hemmzonen mm | entspricht einer Streptomycin-konzentration von mg je ml | Streptomycingehalt der Randengewebe in % |
|---|---|---|---|
| 0—1 | 22 | 3.2 | 100 |
| 5—6 | 22 | 3.2 | 100 |
| 10—11 | 19 | 0.6 | 20 |
| 15—16 | 15 | 0.06 | 2 |
| 20—21 | 14 | 0.03 | 1 |
| 25—26 | 14 | 0.03 | 1 |
| 30—31 | 14 | 0.03 | 1 |

Tabelle 6 läßt ein überraschend geringes Diffusionsgefälle des Streptomycins im Innern der Randengewebe erkennen; es ist also während der Versuchszeit verhältnismäßig weit vorgedrungen. Erst in einem Abstand von 15 bis 20 mm von der Stirnfläche ist der Streptomycingehalt der Randengewebe auf 2 bis 1 % gesunken. Im übrigen bestätigt Tabelle 6, daß das Streptomycin im Innern der Randengewebe in aktiver Form vorhanden bleibt; wenn es also die Randenzellen (im Gegensatz zu den Zellen aus Tomatenblättern) nicht meßbar zu schädigen vermag, so müssen ihm dort die Angriffspunkte fehlen.

## § 5. Der Wirkungsgrad der untersuchten Toxine

Frage: Wie hoch liegt der Wirkungsgrad der in Tabelle 4 besprochenen Welketoxine und Antibiotica? Wir gliedern diese Frage in zwei Teilfragen:

a) Welche Giftmenge ist bei den verschiedenen Toxinen je Kilogramm Lebendgewicht notwendig, um an pflanzlichen oder tierischen Objekten Schädigungen von einer bestimmten Intensität auszulösen? Und

b) bei welcher Konzentration beginnt die schädigende Wirkung eines bestimmten Toxines?

### a) Die kritische Dosis der verschiedenen Toxine

Wir gliedern diesen Abschnitt in drei Unterabschnitte:

I. Wie hoch liegt bei den echten Welketoxinen die kritische Dosis, um an jungen Tomatensprossen Nekrosen von einer bestimmten Intensität auszulösen?

II. Wie hoch liegt bei den in Tabelle 4 besprochenen Antibiotica die kritische Dosis, um an pflanzlichen oder tierischen Organismen Schädigungen von einer bestimmten Intensität auszulösen? Und

III. Wie hoch liegt die kritische Dosis bei den parasitogenen Toxinen der Human- und Veterinärmedizin?

#### I. Die Lage der kritischen Dosis bei den echten Welketoxinen

Aus Gründen, die S. 163 kurz dargelegt wurden, bestimmen wir bei den echten Welketoxinen die kritische Dosis stets an ein und demselben Testobjekt, nämlich an Tomatensprossen.

Nicht alle Welkestoffe, die in Tabelle 4 aufgeführt wurden, fallen für diese Besprechung gleichermaßen ins Gewicht. Wir eliminieren das reine Lycomarasmin und die reine Fusarinsäure, weil die Frage ihrer Synergismen (ihres Zusammenwirkens mit andern Substanzen im Innern des Wirtes) noch nicht abschließend geklärt ist.

Mit diesen Einschränkungen dürfen wir sagen, daß bei den vier in Tabelle 4 besprochenen echten Welketoxinen die Wirkungsschwelle für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen zwischen 0,2 und 20 mg je Kilogramm Lebendgewicht liegt; im arithmetischen Mittel beträgt sie 12,6 mg. Es braucht somit im Durchschnitt der vier hinlänglich bekannten pflanzlichen Welketoxine rund 12,6 mg Substanz je Kilogramm Lebendgewicht, um an Tomatensprossen Schädigungen vom Intensitätsgrad 1.5 auszulösen.

Stoffe mit einer derart hohen Wirkungsschwelle dürfen schwach giftig genannt werden. Eine Faustregel der chemischen Industrie bezeichnet einen Schwellenwert von 50 mg je Kilogramm Lebendgewicht für ein Chemotherapeuticum als eine mittlere Toxizität. Mit ihrem Durchschnittswert von 12,6 mg, um je Kilogramm

Lebendgewicht die Schädigungsintensität 1.5 auszulösen, bewegen sich also die pflanzlichen Welketoxine in einem Toxizitätsbereich, den die menschliche Toxikologie als unerwünschte Nebenwirkung eines Chemotherapeuticums gerade noch in Kauf nimmt. Nur macht der toxische Effekt, wir wiederholen es, bei den pflanzlichen Welketoxinen (anthropozentrisch betrachtet) den eigentlichen Daseinszweck aus, während er bei den Chemotherapeutica der Humanmedizin nur eine lästige und nach Möglichkeit zu eliminierende Nebenerscheinung darstellt.

### II. Die Lage der kritischen Dosis bei den Antibiotica

Frage: Welche Substanzmenge ist bei den in Tabelle 4 genannten Antibiotica je Kilogramm Lebendgewicht notwendig, um bei pflanzlichen oder tierischen Organismen Schädigungen von einer bestimmten Intensität auszulösen?

Wir betrachten zunächst die Wirkungsschwellen für ein pflanzliches Beispiel, nämlich für Tomatensprosse, also für Blütenpflanzen. Wir müssen dabei das Penicillin eliminieren; denn es ist wahrscheinlich als solches ungiftig und löst offenbar die in den Tomatensprossen auftretenden Schädigungen durch seine Spaltprodukte aus (S. 178).

Aus demselben Grunde müssen wir die Kojisäure eliminieren, da sie erst in Dosen von über 3 g je Kilogramm Lebendgewicht an den Tomatensprossen eine Schädigung von der Intensität 1.5 verursacht. Bei einer rein physikalisch wirkenden (weil die Intermizellarräume verstopfenden) Substanz wie Inulin beträgt die für die Erzielung desselben Effektes zu applizierende Substanzmenge bloß 1600 mg je Kilogramm Lebendgewicht (Gäumann und Jaag, 1950), und für Carbowax 4000 beträgt sie laut Tabelle 4 nur 1000 mg. Die dosis minima für die Kojisäure liegt also rund doppelt so hoch wie für diese beiden chemisch inerten, bloß mechanisch wirkenden Stoffe. Wir dürfen deshalb die Kojisäure praktisch gesprochen für Tomatensprosse als ungiftig ansehen.

Als für Tomatensprosse giftig können somit unter den hier zu besprechenden Antibiotica nur die Penicillsäure, das Streptomycin, das Aureomycin und das Chloromycetin gelten. Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen reicht bei ihnen von 110 bis 680 mg je Kilogramm Lebendgewicht. Im arithmetischen Mittel beträgt sie für diese vier phytotoxisch wirkenden Antibiotica 293 mg je Kilogramm Lebendgewicht. Bei den vier echten Welketoxinen betrug der entsprechende Wert 12,6 mg. Die echten Welketoxine sind somit (gemessen an der kritischen Dosis) im groben Durchschnitt für unser Testobjekt (Tomatensprosse) nur etwa 23mal giftiger als die von der Humanmedizin entwickelten Antibiotica.

Wie steht es nun mit der Giftigkeit der in Tabelle 4 genannten Antibiotica für tierische Objekte? Wir haben die mittlere letale Dosis für Mäuse ($LD_{50}$) bei intravenöser Applikation auf der linken Seite der Tabelle 8 zusammengestellt.

Die mittlere letale Dosis, d. h. die Giftmenge, bei der 50 % der Versuchstiere eingehen, entspricht biologisch ungefähr dem Wert, den wir bei unsern Tomatensprossen als die „dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen" bezeichnen. Als kritische Schädigungsstufe verwenden wir ja die Intensität 1.5; Stufe 0 bedeutet Wohlergehen, Stufe 4 bedeutet Tod, völlige Nekrose. Die Stufe 1.5 liegt also nahe der Mitte zwischen Unschädlichkeit und tödlicher Wirkung. Eine $LD_{50}$, wie die Humanmedizin sie verwendet, d. h. ein Absterben der Hälfte der Versuchsindividuen, ist bei den Blütenpflanzen nicht verwendbar; denn die Blütenpflanzen sterben bei der Applikation eines Toxines nicht, wie die Tiere, als Ganzes; sie sind ja auch keine Ganzheit und besitzen kein geschlossenes Zirkulationssystem.

Die Tabelle 8 zeigt, daß bei den sechs in ihr dargestellten Antibiotica die mittlere Giftigkeit für Tomatensprosse in der Dimension ungefähr gleich hoch ist wie ihre mittlere Giftigkeit für Mäuse; das arithmetische Mittel aus den sechs für Tomatensprosse angeführten Zahlenwerten beträgt 808 mg; das arithmetische Mittel aus den zehn für Mäuse angeführten Werten beträgt 512; sie sind also in der Größenordnung identisch.

Dies ist überraschend. Die medizinisch verwendeten Antibiotica wurden ja unter dem Gesichtspunkte ausgewählt, daß sie für Warmblüter möglichst ungiftig sein sollten; dennoch liegt ihre mittlere Giftigkeit für Mäuse und für Tomatensprosse ungefähr gleich hoch. Aus dieser Koinzidenz ergeben sich interessante toxikologische Fragen; so ist es kaum wahrscheinlich, daß alle diese Substanzen im pflanzlichen und im tierischen Körper an derselben Stelle angreifen; wie kommt es, daß dennoch schlußendlich ihr Effekt bei beiden Organismengruppen ungefähr gleich groß ist?

### III. Die kritische Dosis bei den parasitogenen Toxinen der Human- und Veterinärmedizin

Einige neuere, mit kristallisierten parasitogenen Toxinen der Humanmedizin ausgeführte Bestimmungen wurden in Tabelle 7 zusammengestellt. Sie bewegen sich für das Tetanus- und das Botulinustoxin in völlig anderen Dimensionen als die soeben besprochenen 12,6 mg, nämlich in der Größenordnung von $10^{-6}$ bis $10^{-7}$ mg je Kilogramm Lebendgewicht. Diese beiden Toxine sind somit für Meerschweinchen und Maus ungeheuer viel giftiger, nämlich 10 bis 100 Millionen mal giftiger als die pflanzlichen Welketoxine für die geprüften Blütenpflanzen.

*Tabelle 7*

Die minimale letale Dosis bei humanpathogenen Bakterientoxinen in mg je kg Lebendgewicht
(Umgerechnet nach MacLeod und Pappenheimer, 1948)

| Tier | Diphterietoxin mg | Tetanustoxin mg | Botulinustoxin mg |
|---|---|---|---|
| Meerschweinchen ..... | 0.000 3 | 0.000 000 8 | 0.000 000 8 |
| Maus ..... | 0.3 | 0.000 005 | 0.000 200 |

*Tabelle 8*

Die Toxizität einiger Antibiotica für Makro- und Mikroorganismen

| Substanz | dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen mg je kg Frischgewicht | dosis media letalis ($LD_{50}$) für Mäuse mg je kg Lebendgewicht | Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten von Tomatenblättern molar | Schwellenwert für die Wachstumshemmung von | Schwellenwert für die Wachstumshemmung molar |
|---|---|---|---|---|---|
| Penicillin G | 580 | 1000—2000 (Na—salz) | $> 1.7 \cdot 10^{-2}$ | *Staphylococcus aureus* | $10^{-8}$ |
| Penicillsäure | 110 | 250 | $7.5 \cdot 10^{-6}$ | *Staphylococcus aureus* | $10^{-4}$ |
| Kojisäure | 3100 | 150—1000 | $3.5 \cdot 10^{-3}$ | *Staphylococcus aureus* | $10^{-2}$ |
| Streptomycin | 680 | 225 | $7.5 \cdot 10^{-6}$ | *Escherichia coli* | $10^{-6}$ |
| Aureomycin | 220 | 50—134 | $1.7 \cdot 10^{-5}$ | *Staphylococcus aureus* | $10^{-6}$ |
| Chloromycetin | 160 | 110—200 | $1.3 \cdot 10^{-3}$ | *Escherichia coli* | $10^{-6}$ |

Einzig im Bereiche des Diphtherietoxines scheinen sich die Wirkungsschwellen der humanpathogenen Bakterientoxine und der pflanzenpathogenen Welketoxine unmittelbar zu berühren. Die dosis letalis minima von Diphtherietoxin für die Maus beträgt 0,3 mg je Kilogramm Lebendgewicht. Die dosis minima, um an Tomatensprossen bestimmte Nekrosen auszulösen, beträgt bei Alternariasäure 0,2 mg je Kilogramm Lebendgewicht. Die beiden Schwellenwerte sind somit identisch.

Nur bleibt zu berücksichtigen, daß in Tabelle 4 die 0,2 mg der Alternariasäure den maximalen Giftwert der bis jetzt bekannten pflanzenpathogenen Toxine darstellen, während umgekehrt in Tabelle 6 die 0,3 mg Diphtherietoxin für die Maus dem minimalen Giftwert für die humanpathogenen Toxine entsprechen. Doch sind hier zweifelsohne noch erhebliche Verschiebungen möglich, einerseits in der Richtung, daß unter den pflanzenpathogenen Toxinen noch stärker wirkende Stoffe oder stärker wirkende Synergismen gefunden werden, als wir sie zur Zeit kennen, und anderseits in der Richtung, daß bei den humanpathogenen Toxinen auch weniger empfindliche Tiere als die zwei in Tabelle 7 genannten Arten untersucht werden; so ist zwar der Hund für das Diphtherietoxin sehr empfindlich, aber äußerst widerstandsfähig gegen das Botulinus- und das Tetanustoxin.

Die Giftigkeitsbereiche der pflanzenpathogenen Welketoxine und der humanpathogenen Bakterientoxine werden sich also wahrscheinlich mit der Zeit noch stärker nähern; aber die Tatsache wird wohl stets bestehen bleiben, daß die humanpathogenen Bakterientoxine für die Warmblüter erheblich giftiger, erheblich wirkungsvoller sind als die pflanzenpathogenen Welketoxine für ihre pflanzlichen Wirte.

Dieser höhere Wirkungsgrad der humanpathogenen Bakterientoxine, verglichen mit den pflanzenpathogenen Welketoxinen, mag durch zwei Faktoren

bedingt sein, einmal durch die unterschiedliche Wärmetönung, unter der sich bei ihnen die Einwirkung auf den Wirt abspielt, und sodann durch die unterschiedliche Organisationshöhe der beiden Organismengruppen.

Was zunächst die unterschiedliche Wärmetönung anbetrifft, so agieren die Toxine im Körper der Warmblüter bei einer Temperatur von rund 37 ° C, im Innern der Blütenpflanzen dagegen bei der Lufttemperatur der Umwelt (in unsern Testversuchen bei etwa 23 °). Bei den Welketoxinen steigt jedoch der toxische Effekt mit steigender Umwelttemperatur erheblich an (GÄUMANN und NAEF-ROTH, 1950, für das Lycomarasmin; GÄUMANN, 1951, für das Patulin). Auch die pflanzenpathogenen Toxine würden deshalb noch bedeutend stärker zu wirken vermögen, als Tabelle 4 angibt, wenn sie bei 37 ° statt bei 23 ° C wirken könnten.

Noch wichtiger ist jedoch die unterschiedliche Organisationshöhe der beiden Organismengruppen. Der Körper der Warmblüter ist ungleich komplizierter gebaut als der Körper einer Blütenpflanze, und es fällt deshalb einem histotropen Toxin ungleich leichter, in ihm eine entscheidende Lebensfunktion zu lähmen; die Warmblüter sind deshalb schon von Natur aus für ihre spezifischen Toxine ungleich sensibler als die Blütenpflanzen.

### b) Die Lage der Konzentrationsschwelle bei den verschiedenen Toxinen

Wir gliedern diesen Abschnitt, wie den vorangehenden, in drei Unterabschnitte, nämlich

I. Wie hoch liegt bei den echten Welketoxinen die kritische Konzentration, um bei pflanzlichen Organismen bestimmte Schädigungen auszulösen?

II. Wie hoch liegt bei den in Tabelle 4 besprochenen Antibiotica die kritische Konzentration, um bei pflanzlichen Objekten derartige Schädigungen auszulösen? Und

III. Wie hoch liegt bei einigen Toxinen der Humanmedizin die kritische Konzentration, um an tierischen Zellen bestimmte Schädigungen auszulösen?

#### I. Die Lage der Konzentrationsschwelle bei den echten Welketoxinen

Wir besprechen die Lage der Konzentrationsschwelle für zwei pflanzliche Objekte, nämlich für die Störung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus den Grundgeweben von Tomatenblättern einerseits, und sodann für die Hemmung des Wachstums von zwei humanpathogenen Bakterien, *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* anderseits. Bei den Protoplasten aus Tomatenblättern handelt es sich gewissermaßen um ein natürliches Objekt der Welketoxine; die beiden humanpathogenen Bakterien stellen dagegen bloß ein zufälliges Objekt dar und wurden nur ausgewählt, um eine Vergleichsbasis für die Giftigkeit der für diese Bakterien spezifisch wirkenden Antibiotica zu erhalten.

Die erste Teilfrage lautet: Bei welcher Konzentration liegt die Wirkungsschwelle der Welketoxine für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern? Mit andern Worten: Welche Konzentration muß ein Toxin in den sensibeln Geweben des Wirtes erreichen, um dort eine manifeste Störung der osmotischen Verhältnisse auszulösen?

Bei der Verwendung des Ausdruckes Wirkungsschwelle sollten wir uns jedoch stets der Ausführungen auf S. 169 erinnern, wonach die echte biologische Wirkungsschwelle der betreffenden Toxine jenseits unseres Nullpunktes liegt. Eine Zelle ist krank bzw. durch ein Toxin geschädigt, lange bevor diese Schädigung histologisch bemerkbar wird. Beim Schnittpunkt unserer Regressionsgeraden mit der x-Achse ist somit die echte biologische Wirkungsschwelle schon in einem gewissen Betrage überschritten worden, und es hat bereits ein für uns Menschen erkennbares Ausmaß der toxischen Schädigung eingesetzt. Doch ist dieser methodische Fehler bei den meisten Toxinen ungefähr gleich groß und deshalb nicht weiter irreführend.

Die Konzentrationsschwellen, bei deren Überschreitung die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern durch die echten Welketoxine meßbar geschädigt werden, liegt in Tabelle 4 größenordnungsmäßig zwischen $10^{-4}$ und $10^{-7}$ molar (reines Lycomarasmin scheidet aus, weil es im Innern der pflanzlichen Gewebe nicht als solches agiert, sondern in Form des äquimolaren Lycomarasmin-Eisen-Komplexes); im arithmetischen Mittel der Zehnerpotenzen liegt die Schädigungsschwelle bei der Konzentration von $10^{-5.2}$ molar.

Die Werte für die Hemmung des Wachstums der beiden in Tabelle 8 genannten humanpathogenen Bakterien (*Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli*) wurden auf Grund der Angaben der Literatur (Patulin) oder auf Grund eigener Versuche (die übrigen fünf Substanzen) in Tabelle 9 zusammengestellt.

*Tabelle 9*

Die Toxizität einiger Welketoxine für zwei humanpathogene Mikroorganismen

| Welketoxin | Schwellenwert für die Wachstumshemmung von | |
|---|---|---|
| | *Staphylococcus aureus* molar | *Escherichia coli* molar |
| Reines Lycomarasmin ..... | $> 10^{-2}$ | $> 10^{-2}$ |
| Lycomarasmin-Eisen-Komplex.. | $> 10^{-2}$ | $> 10^{-2}$ |
| Reine Fusarinsäure ..... | ca. $2.5 \cdot 10^{-3}$ | $2.5 \cdot 10^{-3}$ |
| Enniatin A ..... | $0.72 \cdot 10^{-5}$ | $> 4.5 \cdot 10^{-2}$ |
| Alternariasäure..... | $> 10^{-2}$ | $> 10^{-2}$ |
| Patulin ..... | $0.92 \cdot 10^{-4}$ | $1.2 \cdot 10^{-4}$ |

Da es sich bei den zwei humanpathogenen Bakterien um Mikroorganismen handelt, die den Welketoxinen völlig wesensfremd gegenüberstehen, so kann es nicht überraschen, daß mehrere Welketoxine, nämlich das Lycomarasmin, der Lycomarasmin-Eisen-Komplex und die Alternariasäure, gegen sie wirkungslos sind, desgleichen das Enniatin A gegen *Escherichia coli.* Im Durchschnitt der verbleibenden Welketoxine (die also eine meßbare Wirkung auf die zwei Testbakterien ausüben) liegt der Schwellenwert für die Wachstumshemmung bei der Konzentration von $10^{-3.8}$ molar.

**II. Die Lage der Konzentrationsschwelle bei den Antibiotica**

Frage: Bei welcher Konzentration beginnt bei pflanzlichen Zellen die schädigende Wirkung der in Tabelle 4 besprochenen Antibiotica?

Wir beschränken uns auf zwei Objekte, nämlich ein spezifisches (zwei humanpathogene Bakterien) und ein beziehungsloses (die Protoplasten aus Tomatenblättern).

Die Hemmungswerte für zwei humanpathogene Bakterien *(Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli)* sind auf der rechten Seite der Tabelle 8 zusammengestellt. Bei den vier therapeutisch verwendbaren Antibiotica (Penicillin, Streptomycin, Aureomycin und Chloromycetin) liegt das arithmetische Mittel der Schwellenwerte für die Hemmung des Wachstums der beiden Bakterien bei $10^{-6.5}$ molar; im arithmetischen Mittel aller sechs in Tabelle 4 bzw. 7 besprochenen Antibiotica liegt der Schwellenwert bei $10^{-5.3}$ molar.

Bei der Betrachtung dieser Zahlen ist zu bedenken, daß *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* für die vier therapeutisch verwendbaren Antibiotica besonders sensibel sind und daß die betreffenden Antibiotica überhaupt erst auf Grund dieser Sensibilität selektioniert wurden. Man würde deshalb vermuten, daß bei den Antibiotica die Schwellenwerte für die Hemmung des Wachstums dieser beiden Bakterien bei einer erheblich stärkeren Verdünnung liegen als die Schwellenwerte für die Schädigung beliebiger pflanzlicher Objekte, z. B. für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern.

Dies ist jedoch merkwürdigerweise nicht der Fall. Im arithmetischen Mittel der Zehnerpotenzen der sechs in Tabelle 8 besprochenen Antibiotica liegt der Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern bei der Konzentration von $10^{-4.2}$ molar, der Schwellenwert für die Wachstumshemmung von *Staphylococcus* und *Escherichia* bei $10^{-5.3}$ molar, also bloß um eine Zehnerpotenz niedriger. Die in Tabelle 8 aufgeführten Antibiotica wirken also im groben Durchschnitt auf ihre spezifischen Mikroorganismen nur etwa zehn- bis hundertmal giftiger als auf die unspezifischen, willkürlich als Testobjekt ausgewählten Gewebe von Tomatenblättern; ihr Wirkungsspektrum reicht somit fast unverändert von den Bakterien bis in die Blütenpflanzen hinein, d. h. vom einen Ende des Pflanzenreiches zum andern.

Im einzelnen bestehen naturgemäß zwischen den verschiedenen Antibiotica erhebliche individuelle Verschiedenheiten. Penicillin mit dem höchsten Verdünnungstiter, also mit der höchsten Giftigkeit für *Staphylococcus aureus*, ist für die Protoplasten aus Tomatengeweben ungiftig; Chloromycetin ist für *Escherichia* immer noch rund tausendmal giftiger als für die Gewebe aus Tomatenblättern. Streptomycin und Aureomycin sind dagegen für ihre spezifischen Mikroorganismen ungefähr gleich giftig wie für die Gewebe aus Tomatenblättern. Und Penicillsäure und Kojisäure, zwei medizinisch nicht verwendbare Antibiotica, sind für *Staphylococcus aureus* rund zehnmal weniger giftig als für die Gewebe aus Tomatenblättern.

Diese verhältnismäßig hohe Giftigkeit der Antibiotica für die Protoplasten aus Tomatenblättern deckt sich mit der S. 196 besprochenen Lage der kritischen Dosen für die Schädigung ganzer Tomatensprosse durch diese Antibiotica.

Es ergibt sich somit die folgende Situation. Im Mittelpunkt des Wirkungsfeldes der echten Welketoxine stehen Blütenpflanzen; denn sie werden als spezifische Toxine von spezifischen Krankheitserregern der Blütenpflanzen gebildet und müssen deshalb primär auf ihre spezifischen Wirte, eben Blütenpflanzen, einwirken; dennoch erstreckt sich ihr Wirkungsspektrum bis an das entgegengesetzte Ende des Pflanzenreiches, nämlich bis zu den humanpathogenen Bakterien (Tabelle 9); ihre Wirkungsschwelle liegt dort immerhin um zwei bis drei Zehnerpotenzen niedriger als diejenige der echten spezifischen Antibiotica.

Anderseits werden die Antibiotica von beliebigen saprophytischen Mikroorganismen gebildet, und sie wurden bloß unter dem Gesichtspunkte ausgewählt, daß sie einerseits für humanpathogene Bakterien möglichst giftig und anderseits für uns Menschen möglichst ungiftig seien. Im Mittelpunkt ihres Wirkungsfeldes stehen somit humanpathogene Bakterien; dennoch erstreckt sich auch ihr Wirkungsspektrum bis an das entgegengesetzte Ende des Pflanzenreiches, nämlich bis zu den Blütenpflanzen hinüber; ihre Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bloß um eine bis zwei Zehnerpotenzen niedriger als diejenige der echten, spezifischen Welketoxine.

Die beiden Wirkungsbereiche überschneiden sich somit weit stärker als wir gefühlsmäßig erwartet hätten. In dieser gemeinsamen Empfindlichkeit der Bakterien und der Protoplasten aus Tomatenblättern für dieselben biogenen Toxine kommt offenbar zum Ausdruck, daß es sich bei beiden Objekten eben doch um pflanzliche Organismen mit grundlegenden gemeinsamen Eigenschaften handelt.

### III. Die Lage der Konzentrationsschwelle bei einigen Toxinen der Humanmedizin

Zum Vergleich mit den im vorangehenden Unterabschnitt besprochenen Schwellenwerten für die Wirkung einiger Antibiotica auf pflanzliche Gewebe möchten wir nachfolgend die Konzentrationsschwellen besprechen, bei welchen die wichtigeren Antibiotica und sodann einige andere Toxine auf tierische Gewebe wachstumshemmend zu wirken beginnen.

Was zunächst die Antibiotica anlangt, so besitzt Penicillin bis zur Konzentration von $2 \cdot 10^{-2}$ molar keine wachstumshemmende Wirkung auf tierische Gewebekulturen (Bucher, 1947); desgleichen besitzt Streptomycin bis zur Konzentration von $2 \cdot 10^{-4}$ molar keine wachstumshemmende Wirkung (Barski, 1948). Aureomycin verursacht dagegen eine totale Wachstumshemmung bei der Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ molar, desgleichen Chloromycetin bei der Konzentration von $3 \cdot 10^{-3}$ molar (Lépine, Barski und Maurin, 1950).

Die beiden erstgenannten Antibiotica sind somit für tierische Gewebe überhaupt ungiftig, und die beiden letztgenannten sind für tierische Gewebe etwa 100- bis 1000mal weniger giftig als für Tomatengewebe. In dieser geringen Giftigkeit für tierische Gewebe kommt die industrielle Selektionsarbeit zum Ausdruck, da die Antibiotica naturgemäß erst wegen dieser geringen Giftigkeit für die Wirtsgewebe überhaupt therapeutisch verwertbar sind.

Was sodann die Giftigkeit anderer Toxine für tierische Gewebe anlangt, so haben uns die Herren Professor Dr. G. Töndury und Dr. J. Rickenbacher vom anatomischen Institut der Universität Zürich in diesen Fragen beraten. Die Verhältnisse liegen ja in der Human- und Veterinärmedizin ungleich komplizierter als in der Pflanzenpathologie, weil dort bei manchen histotropen Giften, so beim Tetanustoxin, eine unverhältnismäßig starke spezifische Anreicherung des Toxines in den sensiblen Geweben stattfindet; so beträgt nach Tabelle 7 die dosis letalis minima des Tetanustoxines für eine Maus 0,000005 mg je Kilogramm Lebendgewicht; auf das mittlere Gewicht einer Maus umgerechnet, bedeutet das etwa 20 Millionen Molekel, um ein Tier zu töten. Der spezifische Wirkungsort dieser

*Tabelle 10*

Die Grenzkonzentrationen für die Mitosestörung bei einigen tierischen Objekten

| Substanz | Bruttoformel | Molekulargewicht | Testobjekt | Konzentrationsschwelle | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | Gewichtsmengen | molar |
| Colchicin | $C_{22}H_{25}NO_6$ | 399 | Tubifex-Ei | $3.3 \cdot 10^{-6}$ | $8.4 \cdot 10^{-6}$ |
| Stilboestrol | $C_{18}H_{20}O_2$ | 268 | „ | $2.0 \cdot 10^{-6}$ | $7.5 \cdot 10^{-6}$ |
| Phenantrenchinon | $C_{14}H_{20}O_2$ | 220 | „ | $4.0 \cdot 10^{-8}$ | $1.8 \cdot 10^{-7}$ |
| Naphthochinon | $C_{10}H_6O_2$ | 158 | „ | $1.1 \cdot 10^{-7}$ | $7.0 \cdot 10^{-7}$ |
| Benzochinon | $C_6H_4O_2$ | 108 | „ | $5.0 \cdot 10^{-8}$ | $4.6 \cdot 10^{-7}$ |
| Trypoflavin | $C_{14}H_{24}N_3Cl$ | 269 | Kaninchenfibrozyten | $8.3 \cdot 10^{-7}$ | $3.1 \cdot 10^{-6}$ |
| Arsen | $As_2O_5$ | 198 | „ | $5.0 \cdot 10^{-7}$ | $2.5 \cdot 10^{-6}$ |
| Nikotin | $C_{10}H_{14}N_2$ | 162 | „ | $6.7 \cdot 10^{-5}$ | $4.1 \cdot 10^{-4}$ |
| Neutralrot | $C_{15}H_{26}N_4$ | 262 | „ | $5.0 \cdot 10^{-5}$ | $1.9 \cdot 10^{-4}$ |

20 Millionen Molekel liegt jedoch in bestimmten Nervenzentren; wie hoch dort die Konzentrationsschwelle des Tetanustoxines ist, wissen wir nicht.

Zum Vergleich mit unsern botanischen Messungen können deshalb nur jene Toxizitätsbestimmungen herangezogen werden, die mit weniger spezifischen Giften an Hand von Gewebekulturen durchgeführt wurden. Einige Angaben der Literatur wurden in Tabelle 10 zusammengetragen. Mit ihren Konzentrationsschwellen im Bereiche von $10^{-6}$ bis $10^{-7}$ molar erweckt die letzte Spalte der Tabelle 10 nicht den Eindruck, daß tierische Zellen allgemein toxinempfindlicher sind als die von uns untersuchten Protoplasten aus Tomatenblättern. Wir dürfen deshalb vermuten, daß die hohen Giftigkeitswerte der Tabelle 7 vorwiegend durch die organspezifische Wirkung der betreffenden Toxine bedingt werden.

## § 6. Die Beziehungen zwischen Konzentrationsschwelle und Welke-Effekt

Dieser Abschnitt führt uns an die zentrale Frage der vorliegenden Arbeit heran, die ja auf S. 162 folgendermaßen gestellt wurde: Falls die Schädigungen der Tomatensprosse durch ein Welketoxin vorwiegend auf einer Störung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten beruht, so muß sich die summarische Giftigkeit des betreffenden Toxines für Tomatensprosse (eben der Welke-Effekt, gemessen an Hand der dosis minima) sinngemäß mit der Konzentrationsschwelle für die Schädigung der Permeabilität ihrer Protoplasten (gemessen an Hand der kritischen Verdünnungsgrenze des betreffenden Toxines im Gewebestreifentest) decken.

Abb. 25 veranschaulicht die Verteilung der in Tabelle 4 zusammengestellten Welketoxine und Antibiotica im Spannungsfeld zwischen der osmotischen Störungsschwelle einerseits und der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen anderseits.

Es fällt in Abb. 25 auf, daß die Abszisse, die auf der kritischen Dosis für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen aufbaut, bei den wirklich phytotoxisch wirkenden Substanzen (also abgesehen von der Kojisäure) bloß im Intervall zwischen 0,2 und 700 mg je Kilogramm Lebendgewicht, also bloß um den 3500fachen Betrag schwankt, wogegen die Ordinate, die auf der Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern basiert (Gewebestreifenmethode), von der Konzentration $10^{-2}$ molar bis zur Konzentration $10^{-7}$ molar reicht, also um rund den 100 000fachen Betrag variieren kann.

Die Gewebestreifenmethode ist somit rund dreißigmal empfindlicher als die Methode der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen. Dies kann nicht überraschen; denn beim Gewebestreifentest messen wir einen bestimmten eindeutigen Effekt, der durch das betreffende Toxin bei bestimmten einheitlichen Geweben ausgelöst wird. Bei der Bestimmung der dosis minima bewerten wir dagegen, wie schon auf S. 163 ausgeführt wurde, die visuell sichtbar gewordene letzte, wohl meist postmortale Phase der Schädigung ganzer Sprosse, bestehend aus Stengeln, Blattstielen und Blättern.

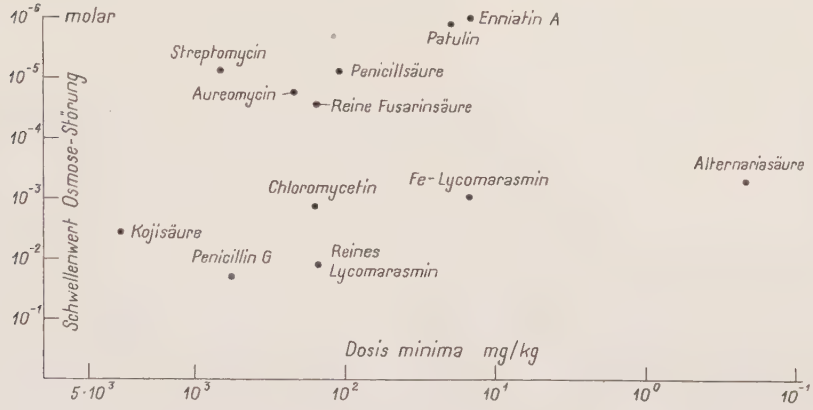



Abb. 25. Die Beziehungen zwischen dem Schwellenwert für die Störung der osmotischen Eigenschaften einerseits und der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen anderseits. Abszisse: Minimale Giftmenge in mg je kg Lebendgewicht, die notwendig ist, um an Tomatensprossen unter bestimmten äußeren Verhältnissen Schädigungen in der Intensität 1.5 auszulösen; von links nach rechts nimmt die benötigte Giftmenge ab, die Giftigkeit der Toxine somit zu. Ordinate: Minimale Giftkonzentration, die notwendig ist, um an Protoplasten aus Tomatenblättern meßbare Schädigungen ihrer osmotischen Eigenschaften hervorzurufen; von unten nach oben nimmt die Konzentrationsschwelle ab, die spezifische Giftigkeit des betreffenden Toxines für die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten somit zu.

Dieser visuell faßbare Schlußeffekt, die Nekrose, wird jedoch von zwei Seiten her verwischt. Einmal von der kausalen Seite her, weil Nekrosen naturgemäß schon an sich unspezifisch, mehrdeutig, sind, und auch durch ganz andere Schädigungen, als wir sie mit der Gewebestreifenmethode messen, ausgelöst oder verstärkt oder abgeschwächt werden können. Und sodann wird der visuell faßbare Schlußeffekt auch von der Seite des Wirtes her verwischt, weil ja die verschiedenen Partien des Wirtes, z. B. die Blattspreiten oder die Leitungsbahnen der Stengel, oft in unterschiedlicher Weise auf ein bestimmtes Toxin ansprechen; die dosis minima stellt deshalb unter Umständen bloß einen Durchschnittswert aus unterschiedlichen, verschieden empfindlichen Geweben dar. Summationen aus heterogenen Effekten führen jedoch in der Biologie häufig zu farbloseren Ausschlägen als die Messung eines eng umschriebenen einheitlichen Vorganges, wie dies bei der Gewebestreifenmethode geschieht.

Auch wenn jedoch die Gewebestreifenmethode einen physikalisch einheitlichen Vorgang, nämlich die unterschiedliche Dehnung oder Kontraktion von Gewebestreifen, mißt, so ist dieser Vorgang doch weit davon entfernt, in seinen biologischen Ursachen einheitlich zu sein. Selbst wenn wir zunächst von den nebenhergehenden andersartigen Schädigungen absehen, über die wir später im Zusammenhang mit den Patulinschäden kurz sprechen werden, so kann auch schon im osmotischen Sektor ein und derselbe Effekt entweder auf einer Schädigung des Zellinhaltes beruhen, durch welche die

Wasseranziehungskraft oder die wasserhaltende Kraft des Plasmas vermindert wurde; oder sie kann umgekehrt auf eine Schädigung der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Plasmamembran zurückgehen, durch welche ihre Wasserpermeabilität erhöht wurde; oder beide Faktorengruppen können gleichzeitig in gleicher oder in entgegengesetzter Richtung verschoben worden sein.

Wenn wir somit im vorliegenden Abschnitt den Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern mit der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen vergleichen, so sind wir uns vollkommen bewußt, daß beide Methoden grob und im Grund genommen biologisch unzulänglich sind. Wir dürfen deshalb die betreffenden Werte nur in großen Zügen, cum grano salis, interpretieren.

Um die in Tabelle 4 besprochenen Welketoxine und Antibiotica irgendwie zu ordnen, gehen wir von der folgenden Überlegung aus. Die als Testobjekte verwendeten Tomatensproßstücke wiegen durchschnittlich etwa 2 g und bestehen zu etwa 80 bis 90 % aus Wasser; sie enthalten somit etwa 1600 bis 1800 mg Wasser. Bei der Bestimmung der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an diesen Tomatensprossen arbeiteten wir in der Regel mit Toxinkonzentrationen von rund $10^{-3}$ molar (S. 165). Die Menge der Toxinlösung, die ein Sproßstück bis zur Erreichung der dosis minima aufnimmt, variiert zwar je nach der Giftigkeit des betreffenden Toxines; doch dürfen wir größenordnungsmäßig annehmen, daß sie etwa 0,2 bis 0,5 ml, also rund 200 bis 500 mg beträgt. Die Toxinlösung wird somit, auch wenn wir von unmittelbarer Adsorption des Toxines durch das Mizellargerüst der Zellwände usw. absehen, im Innern des pflanzlichen Körpers allein schon durch den Zellsaft im groben Durchschnitt um rund eine halbe Zehnerpotenz verdünnt, in den Leitungsbahnen wahrscheinlich stärker, in den entfernten Grundgeweben wahrscheinlich schwächer.

Wenn also ein Toxin beispielsweise schon in einer Verdünnung von $10^{-5}$ bis $10^{-7}$ molar die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern in meßbarer Weise zu schädigen vermag, so dürfen wir annehmen, daß es ein spezifisches Osmosegift darstellt und die charakteristischen Nekrosen an den Tomatensprossen auch noch in einer 100- bis 1000mal stärkeren Verdünnung auszulösen vermag, als sie in der Toxinlösung besteht, die von den Sprossen unmittelbar aufgenommen wird ($10^{-3}$ molar).

Wenn dagegen ein Toxin die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten erst in einer Verdünnung von $10^{-3}$ bis $10^{-4}$ molar meßbar schädigt, dann dürfen wir annehmen, das es höchstens ein mittleres Osmosegift darstellt und daß somit die an den Tomatensprossen zu beobachtenden Nekrosen in einem erheblichen Maße auch durch andere Effekte als durch Störung der osmotischen Vorgänge ausgelöst sein können.

Und wenn endlich ein Toxin die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten der Gewebestreifen erst in einer stärkeren Konzentration als $10^{-3}$ molar meßbar schädigt, so müssen wir annehmen, daß entweder in den

sensiblen Geweben eine erhebliche Anreicherung des Toxins stattfindet oder daß das betreffende Toxin ein schwaches Osmosegift darstellt und daß der toxische Effekt vorwiegend durch andere Schädigungen als durch diejenigen des osmotischen Sektors ausgelöst wird.

In diesem Sinne ordnen wir die Toxine der Tabelle 4 in drei Gruppen:

a) spezifische Osmosegifte. Die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bei ihnen in der Größenordnung von $10^{-7}$ bis $10^{-5}$ molar.

b) mittelstarke Osmosegifte. Die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bei ihnen in der Größenordnung von $10^{-4}$ bis $10^{-3}$ molar.

c) schwache Osmosegifte. Die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt bei einer stärkeren Konzentration als $10^{-3}$ molar.

### a) Die mutmaßliche Wirkungsweise der spezifischen Osmosegifte

Die Gifte dieser Gruppe wirken mutmaßlicherweise vorwiegend nach Art von Koagulasen, wobei wahrscheinlich die Plasmagrenzschicht stärker auf sie anspricht als der übrige Plasmakörper. Durch die Schädigung der Plasmagrenzschicht werden die physikalischen Voraussetzungen der Semipermeabilität in einem Ausmaße zerstört, daß osmotisch wirksame Substanzen aus dem Zellinnern in die Zellwände hinaustreten. Durch die Schädigung des gesamten Plasmakörpers wird überdies seine wasserhaltende Kraft vermindert; das mizellar gebundene Wasser wird freigesetzt, tritt in den Transpirationsstrom der Zellwände hinaus und wird wegverdunstet.

Dieser Gruppe möchten wir die folgenden Giftstoffe der Tabelle 4 zuweisen:

Fusarinsäure (Schwellenwert für die Osmosestörung $2.8 \cdot 10^{-5}$ molar),
Enniatin A (Schwellenwert $9.7 \cdot 10^{-7}$ molar),
Patulin (Schwellenwert $1.3 \cdot 10^{-6}$ molar),
Penicillsäure (Schwellenwert $7.5 \cdot 10^{-6}$ molar),
Streptomycin (Schwellenwert $7.5 \cdot 10^{-6}$ molar),
Aureomycin (Schwellenwert $1.7 \cdot 10^{-5}$ molar),
Dithan D-14 (Schwellenwert $6.7 \cdot 10^{-7}$ molar).

Die reine Fusarinsäure wird in dieser Zusammenstellung nur pro memoria aufgeführt, da sie, wie schon auf S. 195 angedeutet wurde, im Innern der Wirtspflanzen wohl nie für sich allein agiert, sondern stets in Gegenwart von anderen Stoffwechselprodukten des Erregers, welche imstande sind, ihre pathogene Wirkung erheblich zu verschieben.

Die Vertreter dieser ersten Gruppe vermögen die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern schon in Konzentrationen von $10^{-7}$ bis $10^{-5}$ molar deutlich zu schädigen. Da aber anderseits die Toxinlösungen, in welche bei unseren Versuchen die Tomatensprosse gestellt wer-

den, die Konzentration von ungefähr $10^{-3}$ molar besitzen, so genügt es bei den Giftstoffen der vorliegenden Gruppe, wenn die Versuchslösung 100- bis 10 000fach verdünnt in den sensiblen Geweben ankommt, um dort im osmotischen Sektor immer noch entscheidende Schädigungen auszulösen. Es dürfte deshalb keinem Zweifel unterliegen, daß bei ihnen ein wesentlicher Teil der Pathogenese durch diesen Störungseffekt gesteuert wird.

Diese Fähigkeit zur entscheidenden Störung des osmotischen Sektors der Wirtspflanzen ist somit sämtlichen Toxinen dieser Gruppe gemeinsam. Dennoch ist es unwahrscheinlich, daß selbst bei dieser Gruppe von Osmosespezialisten der toxische Effekt nur auf einer Störung des osmotischen Sektors beruht. Dafür sprechen zwei Erwägungen.

1. Wenn die Störung der osmotischen Verhältnisse der Wirtszellen bei sämtlichen Toxinen dieser Gruppe gleichermaßen führend wäre, so müßten sämtliche Vertreter, welche im Gewebestreifentest denselben Schwellenwert besitzen, bei der Bestimmung der summarischen Giftigkeit auch zu derselben dosis minima führen. Im Falle von Enniatin A (Schwellenwert für die Osmoseschädigung $9.7 \cdot 10^{-7}$ molar) und Patulin (Schwellenwert $1.3 \cdot 10^{-6}$ molar) trifft dies zwar zu; denn die dosis minima liegt bei diesen zwei Toxinen im selben Bereich (15 bis 20 mg je kg Lebendgewicht). Bei Penicillsäure und Streptomycin (beide zufällig mit demselben Schwellenwert für die Osmoseschädigung, nämlich $7.5 \cdot 10^{-6}$ molar) ist jedoch die Koinzidenz ungenügend (dosis minima 110 bzw. 680 mg je kg Lebendgewicht); bei diesen zwei Toxinen wird also die zusätzliche Einwirkung der nebenhergehenden Schädigungsfaktoren eine gewichtige Rolle spielen.
2. Einige Toxine der vorliegenden Gruppe lösen am selben Objekt, nämlich an Tomatensprossen, unterschiedliche, für sie charakteristische visuelle Krankheitsbilder aus; wäre die Störung des osmotischen Sektors für sich allein ausschlaggebend, so müßten ja bei sämtlichen Toxinen dieser Gruppe die Krankheitsbilder sich gleich sein. Wir glauben deshalb, daß zwar die Schädigung des osmotischen Sektors bei den Toxinen der vorliegenden Gruppe im Verlauf der Pathogenese dominiert, daß aber die charakteristischen Einzelheiten des Krankheitsbildes jeweils durch andere, nebenhergehende toxische Effekte bestimmt oder mitbestimmt werden, und daß diese nebenhergehenden toxischen Effekte für die verschiedenen Toxine charakteristisch sind.

Welcher Art diese nebenhergehenden pathogenen Effekte vielleicht sein mögen, läßt sich erst am Beispiel des Patulins einigermaßen abschätzen. Im Wirtsplasma kommen ja sowohl R·SH-Körper als auch RS-SR-Körper vor, die ineinander übergehen können (Redoxsystem); sie können in den Zellen eine katalytische Wirkung ausüben, obschon sie nicht direkt in Fermentsysteme eingebaut sind. Nun ist bekannt, daß Patulin eine hohe Reaktionsfähigkeit mit SH-Gruppen besitzt; es bindet die freien oder freiwerdenden SH-Gruppen des Plasmas bis zur Erreichung eines bestimmten Schwellenwertes ab und wird seinerseits durch die SH-Gruppen abgebunden, inaktiviert, und „verschwindet" deshalb im Plasma (Miescher, 1950). Auf diese Weise

wirkt das Patulin allgemein auf das Plasma ein, beeinflußt aber daneben auch direkt die Fermentsysteme.

Um sich über die feineren Vorgänge, die dabei abrollen mögen, eine Vorstellung zu machen, verfolgte REUSSER (1952) den Verlauf der Atmung von Hefezellen unter der Einwirkung des Patulins und entwickelte auf Grund seiner Ergebnisse die folgende Hypothese: Das Patulin besetzt rasch die in der Plasmagrenzschicht stehenden freien SH-Gruppen und diffundiert dann langsam in das Innere des Plasmas. Die semipermeable Grenzschicht scheint dabei kein Hindernis darzustellen; sie ist wahrscheinlich rasch zerstört worden.

Da die Reversibilität der Disulfide in Thiole im Gewebe möglich ist, so kann man sich den Schädigungsvorgang in zwei Reaktionsschritten vorstellen. Ein erster Reaktionsschritt geht vom Patulin zu den R · SH-Verbindungen und führt zur gegenseitigen Blockierung der beiden Partner; dieser Schritt folgt dem Massenwirkungsgesetz und verläuft r a s c h , solange freie SH-Gruppen im Vorrat zur Verfügung stehen.

Ein zweiter Reaktionsschritt beruht darauf, daß wegen der Verminderung der SH-Gruppen die Struktur-S-S-Brücken allmählich aufgelöst werden, um das Verhältnis zwischen oxydiertem und reduziertem Schwefel aufrechtzuerhalten. Durch die auf diese Weise neu freiwerdenden SH-Gruppen erklärt sich das a l l m ä h l i c h e Ansteigen der H e m m u n g s kurve der Atmung und die zunehmende Aufnahme und Inaktivierung von Patulin in der z w e i t e n Phase der pathogenen Wirkung des Patulins auf die Hefezellen. Auf diesem Wege schädigt das Patulin in nachhaltiger Weise nicht nur den Wasserhaushalt, sondern auch die Atmung, also den E n e r g i e s t o f f w e c h s e l des Wirtes.

Von allen diesen Vorgängen vermögen wir zur Zeit an unserem Testobjekt, den Tomatenpflanzen, nur zwei unter sich völlig verschiedenartige Schlußeffekte zu beobachten, nämlich

1. die Störung der T r a n s p i r a t i o n vom Beginn der Patulinaufnahme bis zum fatalen Ende (GÄUMANN und JAAG, 1947), und
2. die grobsinnliche Störung des A u s s e h e n s der Versuchspflanzen im Verlauf der Pathogenese, eben das visuelle Krankheitsbild.

In welcher Weise die eben besprochenen intermediären Reaktionsschritte zu diesem pathologischen Schlußeffekte führen, vermögen wir noch nicht zu übersehen.

### b) Die mutmaßliche Wirkungsweise der mittelstarken Osmosegifte

Die Gruppe der mittelstarken Osmosegifte umfaßt jene Giftstoffe der Tabelle 4, welche die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern erst in einer Konzentration von $10^{-4}$ bis $10^{-3}$ molar in meßbarer Weise schädigen. Da wir bei der Bestimmung der dosis minima, also bei der Bestimmung der summarischen Giftigkeit eines Toxines für den gesamten Tomatensproß, mit Giftkonzentrationen in der Größenordnung von $10^{-3}$ molar arbeiten, so müßten unsere Versuchslösungen, falls der pathogene

Effekt des betreffenden Toxines vorwiegend auf einer Schädigung des osmotischen Sektors beruhen würde, in nahezu voller Konzentration in den sensiblen Geweben ankommen; sie dürften also unterwegs durch Adsorption und Verdünnung (Zellsaft!) keine wesentliche Wirkungseinbuße erleiden.

Dieser Gruppe möchten wir zwei Giftstoffe der Tabelle 4 zuweisen, nämlich den Lycomarasmin-Eisen-Komplex (Schwellenwert für die Osmosestörung $9.0 \cdot 10^{-4}$ molar) und die Alternariasäure (Schwellenwert $4.9 \cdot 10^{-4}$ molar).

Beiden Toxinen ist gemeinsam

I. daß sie den Wasserhaushalt der Tomatenpflanzen in spezifisch gleicher Weise stören, und

II. daß sie im Gewebestreifentest nur schwache Schädigungseffekte auslösen (also die osmotischen Verhältnisse der Wirtszellen nur in einem verhältnismäßig geringen Ausmaße schädigen) und dennoch für die gesamten Tomatensprosse ebenso starke Gifte darstellen wie die spezifischen Osmosegifte der Gruppe a).

Wir möchten diese beiden Gesichtspunkte kurz betrachten.

### I. Die Gleichartigkeit der Störung des Wasserhaushaltes der Tomatenpflanzen

Der Verlauf der Störung des Wasserhaushaltes von Tomatenpflanzen durch den Lycomarasmin-Eisen-Komplex und durch die Alternariasäure wurde vor kurzem in dieser Zeitschrift durch Gäumann, Kern und Sauthoff (1952) besprochen. Beiden Toxinen ist gemeinsam, daß auf ihre Applikation sowohl bei den Kurven der Wasseraufnahme als bei den Kurven der kutikularen und stomatären Transpiration ein steiler Leistungsabfall erfolgt (z. B. in der Abbildung 3 der genannten Arbeit); Wasseraufnahme und Wasserabgabe werden somit pathologisch gedrosselt, und zwar in einem ähnlichen Ausmaße. Ferner ist beiden Toxinen gemeinsam, daß auf die Drosselungsphase eine Phase der pathologischen Übersteigerung der Wasseraufnahme und der Transpiration folgt, und zwar bei der Alternariasäure in einer noch stärkeren Ausprägung als beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex. Und endlich ist beiden Toxinen gemeinsam, daß auf den Paroxysmus der zweiten Phase ein nachhaltiger Leistungsabfall im Sektor Wasseraufnahme und Wasserabgabe folgt, wobei sich freilich die Einzelheiten von Fall zu Fall etwas verschieden gestalten mögen.

Dieser gleichartige Verlauf der Störung des Wasserhaushaltes von Tomatenpflanzen unter der Einwirkung des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes und der Alternariasäure läßt vermuten, daß diese beiden Gifte trotz ihrer chemisch völlig verschiedenen Konstitution in einem spezifisch gleichen Rhythmus in den Ablauf des Krankheitsgeschehens eingreifen. Wir werden nämlich demnächst in einer anderen Arbeit zu zeigen haben, daß andere Welketoxine, z. B. die Fusarinsäure, einen spezifisch anderen Verlauf der pathologischen Wasserhaushaltskurven bedingen als der Lycomarasmin-Eisen-Komplex und die Alternariasäure.

Worauf freilich dieser spezifisch gleiche bzw. spezifisch andere Rhythmus in der Störungsfolge des Wasserhaushaltes der Tomatenpflanzen beruht, entzieht sich vorläufig unserer Kenntnis.

**II. Die Diskrepanz zwischen der Störung der osmotischen Verhältnisse der Protoplasten einerseits und der allgemeinen Giftigkeit für Tomatensprosse anderseits**

Wir besprechen zunächst den Sachverhalt für den Lycomarasmin-Eisen-Komplex und hernach gesondert für die Alternariasäure.

Beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex liegt die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern bei $9.0 \cdot 10^{-4}$ molar, also praktisch gesprochen fast bei $10^{-3}$ molar; dennoch vermag der Lycomarasmin-Eisen-Komplex bei jungen Tomatensprossen schon bei Verabreichung von 15 mg je kg Lebendgewicht die charakteristischen Nekrosen von der Intensitätsstufe 1.5 auszulösen. Enniatin A löst derartige Nekrosen ebenfalls bei Applikation von 15 mg je kg Lebendgewicht aus; sein Schwellenwert für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern liegt jedoch bei der Konzentration von $9.7 \cdot 10^{-7}$ molar. Enniatin A ist somit ein rund tausendmal stärkeres Osmosegift als der Lycomarasmin-Eisen-Komplex, besitzt aber in summa auf die Tomatensprosse denselben Effekt wie der Lycomarasmin-Eisen-Komplex.

Diese Diskrepanz läßt sich auf zweierlei Weise erklären; entweder

a) durch die Annahme, daß in den Interkostalfeldern der Tomatenblätter eine spezifische Anreicherung des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes erfolgt; derartige gewebespezifische Anreicherungen bestehen in der Humanmedizin z. B. im Falle des Tetanustoxines. Leider sind wir vorläufig nicht in der Lage, diese Hypothese zu überprüfen, da wir kein genügend feines Reagens für den Lycomarasminspiegel in den Grundgeweben der Tomatenblätter besitzen. Oder

b) als eine zweite Möglichkeit kann man sich vorstellen, daß der Schwerpunkt der toxischen Wirkung beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex ganz oder teilweise an einer anderen Stelle liegt als beim Enniatin A. Bei diesem letzteren ist es durchaus möglich, daß die entscheidende Schädigung des Wirtes tatsächlich im osmotischen Sektor erfolgt; denn eine Verdünnungsschwelle zwischen einem Millionstel und einem Zehnmillionstel für die Schädigung der osmotischen Verhältnisse entspricht schon einer erheblichen spezifischen Giftigkeit. Beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex müßten wir dagegen annehmen, daß er neben den osmotischen Funktionen des Wirtes noch andere Prozesse in entscheidender Weise schädigt und dann durch die Summation all dieser Einwirkungen denselben pathogenen Effekt hervorruft, wie ihn das Enniatin A schon durch seine spezifische Einwirkung auf die osmotischen Funktionen des Wirtes für sich allein auslöste.

Ebenso unklar liegen die Verhältnisse beim zweiten Beispiel, bei der Alternariasäure. Ihre spezifische Giftigkeit für die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern ist ungefähr ebenso groß wie diejenige des Lycomarasmin-Eisen-Komplexes; denn der Schwellenwert liegt in Tabelle 4 bei der Konzentration von $4.9 \cdot 10^{-4}$ molar; dagegen beträgt die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an Tomatensprossen bloß 0.22 mg je kg Lebendgewicht; sie ist also rund hundertmal niedriger als beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex. Wir müssen somit annehmen, daß die Alternariasäure noch andere Funktionen des Wirtes als bloß die osmotischen Vorgänge in hochgradiger Weise schädigt und dann durch die Summation dieser Effekte die rund hundermal größere Schädigung des Wirtes zustande bringt. In diesem Sinne würde sich die Alternariasäure zum Lycomarasmin-Eisen-Komplex ähnlich verhalten wie der Lycomarasmin-Eisen-Komplex zum Enniatin A.

Eine besondere Schwierigkeit für die Deutung der pathogenen Wirkung der Alternariasäure ergibt sich jedoch aus dem Widerspruch, daß die Alternariasäure einerseits die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern nicht in außergewöhnlicher Weise schädigt (Konzentrationsgrenze im Gewebestreifentest $4.9 \cdot 10^{-4}$ molar) und anderseits doch für die Tomatenpflanzen eines der stärksten Transpirationsgifte darstellt, das wir zur Zeit kennen.

Wir haben kürzlich in dieser Zeitschrift (Gäumann, Kern und Sauthoff, 1952) berichtet, daß die Alternariasäure bei Tomatensprossen sowohl quantitativ als qualitativ dieselben Transpirationsstörungen auslöst, wenn sie in einer Verdünnung von 1 Millionstel molar (Abb. 6) oder in der Verdünnung von 1 Tausendstel molar (Abb. 3 bis 5) verabreicht wird. Erst bei der Verdünnung von $10^{-7}$ molar (Abb. 7) wird die kritische Konzentrationsschwelle, bei der die Transpirationskurven nicht mehr den charakteristischen Verlauf zeigen und die visuellen Schädigungen nicht mehr innerhalb der üblichen Frist auftreten, unterschritten.

Im Konzentrationsbereich von $10^{-6}$ bis $10^{-3}$ molar gehorchen somit die Transpirationsstörungen, die durch die Alternariasäure bei den Tomatenpflanzen ausgelöst werden, der Regel von der Proportionalität zwischen Ursache und Wirkung nicht mehr. Wir müssen deshalb annehmen, daß die durch die Alternariasäure ausgelöste Transpirationsstörung schon bei der Konzentration von $10^{-6}$ molar die entscheidende Wirkungsschwelle überschritten hat, oberhalb der auch eine weitere Steigerung der Giftkonzentration um das 1000-fache keine weitere Schädigung des Wasserhaushaltes mehr auszulösen vermag. Die entscheidende Störung des Transpirationsgeschehens der Tomatensprosse erfolgt somit bei der Alternariasäure schon im Konzentrationsbereich von $10^{-7}$ bis $10^{-6}$ molar.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangen wir bei der Berechnung der Toxinmenge, welche die Versuchspflanzen in den von Gäumann, Kern und Sauthoff veröffentlichten Transpirationskurven bis zum Zeitpunkt des Auf-

tretens der ersten Nekrosen aufgenommen haben. Dies ist in Tabelle 11 geschehen. Die eingeklammerten Zahlen der zweiten Spalte geben die Herkunft der betreffenden Werte an; da in den Abb. 3, 6 und 7 der genannten Arbeit nur die Wasser a b g a b e, nicht die aufgenommene Menge Toxinlösung veröffentlicht wurde, haben wir die letztere aus den Versuchsprotokollen übernommen. Die mit n. v. („nicht veröffentlicht") bezeichneten Versuchsreihen sind bis jetzt überhaupt nicht veröffentlicht worden; denn es kann naturgemäß stets nur eine kleine Auswahl aus dem Versuchsmaterial wiedergegeben werden.

*Tabelle 11*

Die Menge Alternariasäure, die in den Transpirationsversuchen von Gäumann, Kern und Sauthoff (1952) bis zum Auftreten der ersten Symptome aufgenommen wurde
Erklärung im Text

| Konzentration der Alternariasäure molar | Dauer der Toxinaufnahme bis zum Auftreten der ersten Nekrosen Stunden | Bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommene Toxinlösung ml | Bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommene Menge Alternariasäure mg | Frischgewicht der Versuchspflanze g | Aufgenommene Menge Alternariasäure pro kg Frischgewicht | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | mg/kg | arithmetisches Mittel |
| $10^{-3}$ | 6 (n. v.) | 5.0 | 2.05 | 54.5 | 38 | |
| | 9 (Abb. 5 2) | 8.8 | 3.6 | 26.5 | 136 | |
| | 14.5 (Abb. 5 1) | 5.6 | 2.3 | 23 | 100 | |
| | 16 (Abb. 3) | 25.2 | 10.3 | 44.3 | 233 | 127 |
| $10^{-6}$ | 11 (Abb. 6) | 29.7 | $1 \cdot 2 \cdot 10^{-2}$ | 53.4 | 0.23 | |
| | 14 (n. v.) | 48.6 | $2 \cdot 0 \cdot 10^{-2}$ | 60.6 | 0.33 | |
| | 15 (n. v.) | 39.7 | $1 \cdot 6 \cdot 10^{-2}$ | 71.9 | 0.23 | 0.26 |
| $10^{-7}$ | 29.5 (Abb. 7) | 35.6 | $1 \cdot 5 \cdot 10^{-3}$ | 60.4 | 0.024 | 0.024 |

Die Werte der Tabelle 11 decken sich überraschend schön mit den nach einer anderen Methode gewonnenen Werten für die dosis minima, die notwendig ist, um an jungen Tomatensprossen Nekrosen von der Intensität 1.5 auszulösen (Tabelle 4).

Werden nämlich die Transpirationsversuche mit einer Alternariasäurekonzentration von $10^{-7}$ molar durchgeführt (Abb. 7 der genannten Arbeit), so vermag das Toxin den Transpirationsablauf noch nicht in typischer Weise aus der Bahn zu werfen; das Toxin prägt dem Transpirationsablauf noch nicht „seinen Willen" auf; der Transpirationsablauf wird zwar gestört, aber noch nicht in der charakteristischen Weise. Ferner treten die visuellen Symptome (Nekrosen usw.) erst sehr spät auf, nämlich erst nach rund 30 Stunden, und auch dann noch zögernd und unscharf. Die 0,02 mg Toxin je kg Lebendgewicht, welche die Versuchspflanze in jenem Zeitpunkt aufgenommen hat, liegen somit erheblich u n t e r dem Schwellenwert für die typische Schädigung des Wirtes.

Werden die Transpirationsversuche mit einer Alternariasäurekonzentration von $10^{-6}$ molar durchgeführt, so rollt die Transpirationsstörung in der für Alternariasäure typischen Weise ab; das Toxin ist also nunmehr konzentriert genug, um dem Wirt „seinen Willen" aufzudrängen. Ferner treten die visuellen Symptome innerhalb der üblichen Frist und in der üblichen Ausprägung auf. Im Zeitpunkt des Auftretens der ersten Nekrosen haben die Versuchspflanzen nach Tab. 11 durchschnittl. 26 mg Alternariasäure je kg Lebendgewicht aufgenommen. Wenn man bedenkt, wieviel Substanz bei derartigen Transpirationsversuchen in den Stengeln haften bleibt, während wir ja auf die ersten Nekrosen in den Blättern abstellen, so wird man überrascht sein, wie gut sich dieser aus den Transpirationskurven errechnete Grenzwert von 0,26 mg mit dem Grenzwert von 0,22 mg je kg Lebendgewicht deckt, der in Tab. 4 nach einer anderen Methode für die dosis minima errechnet wurde. Da einerseits eine Alternariasäurekonzentration von $10^{-7}$ molar und eine Giftmenge von 0,02 mg je kg Lebendgewicht noch nicht ausreichen, um bei den Tomatenpflanzen die charakteristischen transpiratorischen und visuellen Veränderungen hervorzurufen, während anderseits diese Effekte durch die Alternariasäurekonzentration von $10^{-6}$ molar und eine Giftmenge von 0,26 mg je kg Lebendgewicht ausgelöst werden, so muß der kritische Schwellenwert zwischen den Konzentrationen von $10^{-7}$ und $10^{-6}$ molar liegen.

Werden die Transpirationsversuche mit einer tausendmal konzentrierteren Alternariasäurelösung durchgeführt ($10^{-3}$ molar), so wird dadurch der Verlauf der Transpirationskurven nicht mehr verändert; sie gehorchen nach wie vor dem für Alternariasäure üblichen Schema. Auch bei einer tausendmal stärkeren Konzentration vermag somit das Gift nicht mehr, als dem Transpirationsgeschehen des Wirtes „seinen Willen" aufzuprägen.

Auch der Zeitpunkt, in welchem die ersten Nekrosen auftreten, verschiebt sich gegenüber der Konzentration von $10^{-6}$ molar nicht mehr wesentlich; bei der Konzentration von $10^{-6}$ molar erscheinen sie durchschnittlich nach 13 Stunden, bei der Konzentration von $10^{-3}$ molar durchschnittlich nach 11 Stunden. Für eine tausendfache Verstärkung der Giftkonzentration ist diese (statistisch nicht einmal gesicherte) Verfrühung des Welke-Effektes um zwei Stunden belanglos. Es ist somit für den Zeitpunkt des Erscheinens der ersten Symptome gleichgültig, ob wir das Welkegift in einer tausendmal stärkeren oder in einer tausendmal schwächeren Konzentration applizieren; daraus dürfen wir schließen, daß diese 11 bis 13 Stunden vom Wirte her die minimale Zeit darstellen, die er vom Beginn der Giftaufnahme an braucht, um in seiner Symptomausprägung zu der für uns Menschen sichtbaren Endstufe zu gelangen: gleichgültig ob die Giftlösung tausendmal stärker oder schwächer ist, es braucht aus chemischen Gründen 11 bis 13 Stunden, bis der Ablauf der Pathogenese auf einer visuellen Schädigungsstufe angelangt ist.

Im Gegensatz zum Verlauf der Transpirationskurven und zum Zeitpunkt, in welchem die ersten Nekrosen auftreten, wird bei der Alternariasäure durch die tausendmal stärkere Konzentration die Giftmenge verändert, welche die Versuchspflanzen bis zum Zeitpunkt des Auftretens der ersten Nekrosen aufnehmen; bei der Konzentration von $10^{-6}$ molar waren es durchschnittlich 0,26 mg je kg Lebendgewicht, bei der Konzentration von $10^{-3}$ molar sind es durchschnittlich 127 mg, also rund fünfhundertmal mehr. Die Intensität der Symptome ist jedoch in beiden Fällen gleich, nämlich erste Nekrosen. Die tausendmal stärkere Toxinkonzentration hat somit bewirkt, daß die Versuchspflanzen mit Alternariasäure geradezu überschwemmt wurden, und nach Art eines Luxuskonsumes rund fünfhundertmal mehr Alternariasäure aufnahmen, als eigentlich zur Auslösung der betreffenden Symptome notwendig gewesen wäre.

Die Analyse der seinerzeit veröffentlichten Transpirationskurven bestätigt somit nach jeder Richtung hin die Schlußfolgerung, daß die Alternariasäure das Transpirationsgeschehen der Tomatensprosse schon bei einer schwachen Konzentration, nämlich zwischen $10^{-7}$ und $10^{-6}$ molar (wo z. B. der Lycomarasmin-Eisen-Komplex noch keinerlei Effekte auslöst), entscheidend und in typischer Weise zu schädigen vermag. Bei keinem der in Tabelle 4 dargestellten Toxine liegt die Schwelle derart niedrig; keines dieser Toxine ist somit ein derart ausgeprägtes Transpirationsgift wie die Alternariasäure. Und doch ist bei der Alternariasäure die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten, so wie wir sie an Hand der Gewebestreifenmethode messen, überraschend gering; in Abb. 11 liegen die Mittelwerte der vier im Konzentrationsbereich von $10^{-4}$ molar durchgeführten Versuchsreihen ungefähr gleich hoch wie bei den fünf Nullwerten, die mit dest. Wasser erhalten wurden. Alternariasäure vermag somit schon in einer Verdünnung von $10^{-4}$ molar die osmotischen Verhältnisse der Protoplasten aus Tomatenblättern nicht mehr in einem Ausmaß zu schädigen, daß die Störung in einer Streckung oder Verkürzung der Gewebestreifen zum Ausdruck käme. In diesem Sinne betrachtet, erweist sich die Alternariasäure als ein ausgeprägtes Transpirationsgift, aber als ein schwaches Osmosegift.

Eine Lösung dieses Widerspruches kann in zwei Richtungen gesucht werden. Wir können entweder annehmen, daß bei der Alternariasäure (wie wir dies soeben beim Lycomarasmin-Eisen-Komplex in Erwägung gezogen haben) eine spezifische Anreicherung des Toxines in den sensiblen Geweben stattfindet und daß aus diesem Grunde eine tausendmal stärkere Giftkonzentration keinen stärkeren Effekt hervorrruft als eine tausendmal schwächere Konzentration. Oder wir können annehmen, daß es bei gewissen Welketoxinen noch andere Möglichkeiten der Transpirationsstörung gibt als durch simple Schädigung der wasserhaltenden Kraft der Protoplasten und durch Schädigung der Semipermeabilität der Plasmagrenzschichten, wie wir sie mit der Gewebestreifenmethode erfassen. Welcher Art diese anders gelagerte Transpirationsstörung sein könnte, entzieht sich freilich unserer Kenntnis.

Jedenfalls wirft die vorliegende Arbeit auch für die Alternariasäure mehr Fragen auf, als sie zu beantworten vermag.

### c) Die mutmaßliche Wirkungsweise der schwachen Osmosegifte

Bei dieser Gruppe liegt die Konzentrationsschwelle für die Schädigung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern unterhalb $10^{-3}$ molar. Wir möchten ihr aus Tabelle 4 drei Antibiotica zuweisen:

Penicillin G (Schwellenwert bei einer stärkeren Konzentration als $1.7 \cdot 10^{-2}$ molar),
Kojisäure (Schwellenwert $3.5 \cdot 10^{-3}$ molar),
Chloromycetin (Schwellenwert $1.3 \cdot 10^{-3}$ molar).

Reines Lycomarasmin, das mit einem Schwellenwert von $1.2 \cdot 10^{-2}$ molar scheinbar in diese Gruppe gehört, scheidet aus, weil es im Innern der Pflanzen in Form des schon besprochenen Lycomarasmin-Eisen-Komplexes wirksam ist und deshalb in der reinen Form nur chemische Bedeutung besitzt.

Das Penicillin G interessiert uns im vorliegenden Zusammenhang nicht weiter; denn es ist mit einem Schwellenwert oberhalb $1.7 \cdot 10^{-2}$ molar überhaupt kein Osmosegift, noch ist es ein Transpirationsgift, sondern es ruft die an Tomatensprossen zu beobachtenden Schädigungen (dosis minima bei 580 mg je kg Lebendgewicht) wohl auf ganz anderem Wege hervor.

Auch das Chloromycetin beschäftigt uns hier nicht weiter; denn sein Schwellenwert von $1.3 \cdot 10^{-3}$ molar für die Störung der osmotischen Eigenschaften der Protoplasten entspricht ungefähr der dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen (160 mg je kg Lebendgewicht) und wirft deshalb keine besonderen Fragen auf.

Dagegen scheinen die Zahlen für Kojisäure erstaunlich zu sein. Dieses Toxin schädigt die osmotischen Eigenschaften der Protoplasten aus Tomatenblättern bei einer Konzentration von $3.5 \cdot 10^{-3}$ molar; Kojisäure ist also ein rund zehnmal schwächeres Osmosegift als z. B. die Alternariasäure (Schwellenwert bei $4.9 \cdot 10^{-4}$ molar).

Die dosis minima für die Auslösung bestimmter Nekrosen an jungen Tomatensprossen beträgt jedoch bei der Kojisäure 3100 mg je kg Lebendgewicht; sie ist also 10- bis 15000mal größer als bei der Alternariasäure (dosis minima 0,22 mg je kg Lebendgewicht) und bewegt sich in derselben Größenordnung wie bei Inulin und anderen chemisch inaktiven Stoffen. Obschon also die Kojisäure nur ein rund zehnmal schwächeres Osmosegift darstellt als die Alternariasäure, braucht es bei ihr 10- bis 15 000mal mehr Substanz, um an jungen Tomatensprossen ein Krankheitsbild von derselben Intensität hervorzurufen.

Wir vermögen diesen Widerspruch vorläufig nicht zu deuten. Man könnte daran denken, daß die Kojisäure im Inneren des Wirtes enzymatisch aufgespalten und dadurch inaktiviert wird, ähnlich wie das Penicillin durch die Penicillinase; doch muß die Überprüfung dieser Arbeitshypothese auf später verschoben werden.

## Zusammenfassung

1. Bei den bis jetzt bekannten Welketoxinen besteht keine Beziehung zwischen der systematischen Stellung des Erregers und der chemischen Natur des Welketoxines; desgleichen besteht keine Beziehung zwischen der systematischen Stellung des Hauptwirtes und der chemischen Natur des Welketoxines.

2. Die Molekulargewichte der bis jetzt bekannten Welketoxine sind auffallend klein (154 bis 455; Diphtherietoxin 72 000, Botulinustoxin 900 000). Die Ursache scheint in der besonderen Struktur des pflanzlichen Körpers zu liegen, der große Molekel durch seine Zellwände abfiltriert (Selektion durch den W i r t).

3. Das Wirkungsspektrum der geprüften Welketoxine und Antibiotica wurde für Gewebe von Tomaten und Randen (Rote Rüben) verglichen. Enniatin A wirkt auf beide Gewebearten ungefähr gleichermaßen giftig; Alternariasäure und Streptomycin sind für Tomatengewebe giftig, für Randengewebe ungiftig. Streptomycin wird durch Preßsaft aus Randengewebe nicht desaktiviert, sondern dringt in das Innere der Randengewebe ein (Diffusionsgefälle auf 20 mm rund 1 : 100) und bleibt dort in aktiver Form vorhanden; wenn es also in Randengeweben keine manifesten Schädigungen auslöst, so muß es in ihnen keine Angriffspunkte finden und deshalb gleich einem inerten Stoff toleriert werden.

4. Im Durchschnitt der vier hinlänglich bekannten Welketoxine braucht es rund 12,6 mg Substanz je kg Lebendgewicht, um an Tomatensprossen Schädigungen vom Intensitätsgrad 1.5 auszulösen; die bis jetzt bekannten Welketoxine sind also, verglichen mit den humanpathogenen Bakterientoxinen, nur wenig giftig. Als Grenzfall deckt sich jedoch beim stärksten pflanzlichen Welketoxin (Alternariasäure) die Wirkungsschwelle ungefähr mit dem niedrigsten Wert der humanpathogenen Bakterientoxine (Diphtherietoxin für Mäuse; Tabelle 7). — Die wichtigeren Antibiotica sind für ihre spezifischen Mikroorganismen nur etwa zehn- bis hundertmal giftiger als für die Protoplasten aus Tomatenblättern; anderseits ist ihre summarische Giftigkeit für Tomatensprosse ungefähr ebenso groß wie für Mäuse.

5. Je nach der Bedeutung, welche die Permeabilitätsstörung für das Krankheitsgeschehen und für das Zustandekommen des Welke-Effektes besitzt, werden die untersuchten Welketoxine und Antibiotica in drei Gruppen geschieden:

   a) D i e s p e z i f i s c h e n O s m o s e g i f t e schädigen die Permeabilität der Protoplasten aus den Tomatenblättern schon in Konzentrationen von $10^{-7}$ bis $10^{-5}$ molar; hierher gehören Fusarinsäure, Enniatin A, Patulin, Penicillsäure, Streptomycin, Aureomycin und Dithan D-14. Doch wird am Beispiel des Patulins gezeigt, daß auch bei diesen spezifischen Osmosegiften noch andere Funktionen des Wirtes erheblich geschädigt werden als nur die Semipermeabilität der Protoplasten.

b) Die mittelstarken Osmosegifte schädigen die Permeabilität der Protoplasten erst in einer Konzentration von $10^{-4}$ bis $10^{-3}$ molar; somit muß entweder bei ihnen eine Anreicherung des Toxines in den sensiblen Geweben erfolgen oder der Verlauf der Pathogenese wird durch andere Schädigungsbezirke als durch die Osmosestörung gesteuert. In diese Gruppe gehören der Lycomarasmin-Eisen-Komplex und die Alternariasäure. Beiden Toxinen ist gemeinsam, daß sie den Wasserhaushalt der Tomatenpflanzen in spezifisch gleicher Weise stören; für die Alternariasäure wird überdies der Gegensatz herausgearbeitet, daß sie, obschon bloß ein mittelstarkes Osmosegift, ein ausgeprägtes Transpirationsgift darstellt.

c) Die schwachen Osmosegifte schädigen die Permeabilität der Protoplasten aus Tomatenblättern erst bei stärkeren Konzentrationen als $10^{-3}$ molar. Hierher werden Penicillin G, Chloromycetin und Kojisäure gestellt; von diesen drei Antibiotica wirft nur die Kojisäure besondere Probleme auf, weil sie einerseits nur ein rund zehnmal schwächeres Osmosegift darstellt als die Alternariasäure, während es anderseits bei ihr 10- bis 15 000mal mehr Substanz braucht als bei der Alternariasäure, um denselben Welke-Effekt hervorzurufen.

## Literaturverzeichnis


Barski, G., 1948. Action de la streptomycine sur l'infection tuberculeuse en cultures de tissus. (Ann. Inst. Pasteur, **74**, 1—11.)

Birkinshaw, J. H., Bracken, A., Michael, S. E. and Raistrick, H., 1943. Biochemistry and chemistry of Patulin. (Lancet, **2**, 625—630.)

Bolle, A. and Mirimanoff, A., 1950. Antagonism between non-ionic detergents and antiseptics. (Journ. Pharmacy and Pharmacology, **2**, 685—692.)

Boller, A., 1951. Über Lycomarasmin, ein welkeaktives Stoffwechselprodukt aus *Fusarium lycopersici* Sacc. (Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, Nr. 2047, 122 S.)

Brian, P. W., Curtis, P. J., Hemming, H. G., Jefferys, E. G., Unwin, C. H. and Wright, J. M., 1951. Alternaric acid, a biologically active metabolic product of *Alternaria solani* (E. et M.) J. et Gr.; its production, isolation and antifungal properties. (Journ. general Microbiology, **5**, 619—632.)

Brzeski, O. W., 1949. Über das Patulin und einige andere antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte von Pilzen. (Inaug. Diss. E. T. H. Zürich, 68 S.)

Bucher, O., 1947. Die Wirkung von Penicillin auf Gewebekulturen. (Schweiz. Med. Wochenschr., **77**, 849—852.)

Clauson-Kaas, N., Plattner, Pl. A. und Gäumann, E., 1944. Über ein welkeerzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. (Ber. Schweiz. Bot. Ges., **54**, 523 bis 528.)

Cook, A. H., Cox, S. F. and Farmer, T. H., 1948. Antibiotics produced by fungi and a new phenomenon in optical resolution. (Nature, **162**, 4106, S. 61.)

— —, Cox, S. F., Farmer, T. H. and Lacey, M. S., 1947. Production of antibiotics by *Fusaria*. (Nature, **160**, 31—32.)

Dimond, A. E., Heuberger, J. W. and Horsfall, J. G., 1943. A water soluble protectant fungicide with tenacity. (Phytopath., **33**, 1095—1097.)

Engel, B. G., Brzeski, W. und Plattner, Pl. A., 1949. Welkstoffe und Antibiotica. (3. Über die Konstitution des Patulins und der Desoxypatulinsäure.) (Helv. Chim. Acta, **32**, 1752—1758.)

Engler, V., 1950. Influence des substances tensioactives sur la cellule végétale; applications pharmaceutiques. (Thèse 1149 Univ. Genève, 46 p.)

— — et Mirimanoff A., 1951. Synergie et antagonisme de l'association antiseptique-mouillant au point de vue fongistatique. (Pharm. Acta Helv., **26**, 59—67.)

Gäumann, E., 1951. Pflanzliche Infektionslehre. 2. Auflage. (Birkhäuser, Basel, 681 S.)

— —, 1951. Über den Einfluß der Temperatur auf den Welke-Effekt beim toxigenen Welken. (Phytopath. Ztschr., **17**, 330—333.)

— —, 1951. Neuere Erfahrungen mit Welketoxinen. (Experientia, **7**, 441—447.)

— — und von Arx, A., 1947. Antibiotica als pflanzliche Plasmagifte II. (Ber. Schweiz. Bot. Ges., **57**, 174—183.)

— — und Jaag, O., 1947. Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I—III. (Ber. Schweiz. Bot. Ges., **57**, 3—34, 132—148, 227—241.)

— —, — —, 1950. Über das toxigene und das physikalisch induzierte Welken. (Phytopath. Zschr., **16**, 226—256.)

— —, — — und Braun, R., 1947. Antibiotica als pflanzliche Plasmagifte I. (Experientia, **3**, 70—71.)

— —, Kern, H. und Sauthoff, W., 1952. Untersuchungen über Welketoxine. (Phytopath. Zschr., **18**, 404—415.)

— — et Naef-Roth, St., 1950. L'influence de la température sur le degré de toxicité des toxines phytopathogènes. (C. r. Ac. Sc. Paris, **230**, 258—260.)

— —, — — und Ettlinger, L., 1950. Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. (Phytopath. Ztschr., **16**, 289—299.)

— —, — — et Kobel, H., 1952. L'acide fusarique, une seconde toxine de flétrissement produite par *Fusarium lycopersici* Sacc. (C. r. Ac. Sc. Paris, **234**, 173—174.)

— —, — —, — —, 1952. Les synergismes chez les toxines de *Fusarium lycopersici* Sacc. (C. r. Ac. Sc. Paris, **234**, 276—278.)

— —, — — und Miescher, G., 1950. Untersuchungen über das Lycomarasmin. (Phytopath. Ztschr., **16**, 257—288.)

Gottlieb, D., 1944. The mechanism of wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. (Phytopath., **34**, 41—59.)

Hodgson, R., Peterson, W. H. and Riker, A. J., 1949. The toxicity of polysaccharides and other large molecules to tomato cuttings. (Phytopath., **39**, 47—62.)

— —, Riker, A. J. and Peterson, W. H., 1945. Polysaccharide production by virulent and attenuated crown-gall bacteria. (Journ. Biol. Chem., **158**, 89—100.)

— —, — —, — —, 1947. A wilt-inducing toxic substance from crown-gall bacteria. (Phytopath., **37**, 301—318.)

Höfler, K., 1950. New facts on water permeability. (Protoplasma, **39**, 677—683.)

Jirovec, O., 1949. Der Einfluß des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. (Experientia, **5**, 74—77.)

Lépine, P., Barski, G. and Maurin, J., 1950. Action of chloromycetin and of aureomycin on normal tissue cultures. (Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. **73**, 252—255.)

MacLeod C. M. and Pappenheimer, A. M., 1948. Properties of bacteria which enable them to cause disease. (In Dubos, R. J., Bacterial and mycotic infections of man, Philadelphia, S. 68—89.)

McCallan, S. E. A., Wellman, R. H. and Wilcoxon, Fr., 1941. An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. III. Slope of toxicity curves, replicate tests and fungi. (Contr. Boyce Thompson Inst., **12**, 49—77.)

Miescher, G., 1950. Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum Lycopersicum* L. (Phytopath. Zschr. **16**, 369—397.)

Mirimanoff, A., 1949. Influence des substances tensioactives sur la cellule végétale; applications pharmaceutiques. (Bull. Fédération internat. pharmaceut., **23**, 9 p.)

— — et Bolle, A., 1949. De la toxicité, pour la cellule végétale, des substances tensioactives. (Festschrift P. Casparis, Bern, 5 S.)

Noll, A., 1949. Studien über die Resistenz des Weizenblattes gegen *Penicillium glaucum*. (Phytopath. Zschr., **15**, 447—481.)

Plattner, Pl. A. und Clauson-Kaas, N., 1944. Über ein Welke erzeugendes Stoffwechselprodukt von *Fusarium lycopersici* Sacc. (Helv. Chim. Acta, **28**, 188—195.)

— —, — —, 1945. Über Lycomarasmin, den Welkstoff aus *Fusarium lycopersici* Sacc. (Experientia, **1**, 195—196.)

— —, — —, Boller, A. und Nager, U., 1948. Der hydrolytische Abbau des Lycomarasmins. (Helv. Chim. Acta, **31**, 860—869.)

Pringsheim, E. G., 1931. Untersuchungen über Turgordehnung und Membranbeschaffenheit. (Jahrb. wiss. Bot., **74**, 749—796.)

Reusser, P., 1952. Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. (Phytopath. Zschr., **19**, 221—265.)

Seiler, L., 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. (Ber. Schweiz. Bot. Ges., **61**, 622—663.)

Strugger, S., 1949. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie. (Springer Berlin, 225 S.)

Thatcher, F. S., 1942. Further studies of osmotic and permeability relation in parasitism. (Canadian Journ. Res., **20** C, 283—311.)

Tisdale, W. H. and Flenner, A. L., 1951. Derivatives of dithiocarbamic acid as fungicides. (Contr. Boyce Thompson Inst., **16**, 303—311.)

Ursprung, A., 1923. Zur Kenntnis der Saugkraft VII. Eine neue, vereinfachte Methode zur Messung der Saugkraft. (Ber. Deutsch. Bot. Ges., **41**, 338—343.)

— — und Blum, G., 1916. Zur Methode der Saugkraftmessung. (Ber. Deutsch. Bot. Ges., **34**, 525—539.)

Wright, J. M., 1951. Phytotoxic effects of some antibiotics. (Ann. Bot., N. S. **15**, 493—499.)

Yabuta, T., Kambe, K. and Hayashi, T., 1934. Biochemistry of the bakanaefungus. I. Fusarinic acid, a new product of the bakanaefungus. (Journ. Agr. Chem. Soc. Japan, **10**, 1059—1068, cit. nach Chemical Abstracts **29**, 1937, S. 1132.)

Zehnder, K., 1951. Über die Konstitution der N-Methyl-aminosäuren aus Enniatin A und B. (Inaug. Diss. E.T.H. Zürich Nr. 1983, 1—96.)

*Aus dem Institut für spezielle Botanik*
*der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*
*(Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann)*

*und der Botanischen Anstalt der Universität Basel*
*(Leiter: Prof. Dr. M. Geiger-Huber)*

# Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen

Von

P. Reusser

*Mit 17 Abbildungen*

Inhaltsverzeichnis. — Allgemeiner Teil: I. Einleitung — II. Literaturbesprechung — III. Fragestellung. — Experimenteller Teil: I. Methodisches. 1. Wahl des Versuchsobjektes; 2. Wahl der Apparatur; 3. Herkunft des Giftstoffes; 4. Die Meßgenauigkeit; 5. Über die Veränderlichkeit der Patulinlösungen; 6. Vorbehandlung der Hefe. — II. Das Absterben der Hefezellen unter der Einwirkung des Patulins. — III. Einfluß des Patulins auf die Glucoseatmung und Gärung. 1. Methodisches; 2. Das Atmungs- und Gärungsbild der vergifteten Hefe; 3. Der Einfluß der Suspensionsdichte; 4. Die Abhängigkeit der Hemmung von der Giftkonzentration; 5. Der Temperatureffekt; 6. Der Einfluß des pH. — IV. Das Eindringen des Patulins. 1. Der Einfluß der Glucose auf den Zustand der Hemmung; 2. Der Einfluß der Glucosekonzentration auf die Patulinvergiftung; 3. Der Einfluß der Anaerobie auf die Patulinvergiftung. — V. Die Aufnahme des Patulins in Zusammenhang mit der Hemmung. — A. Die Methodik der Patulinbestimmung. 1. Die Apparatur; 2. Die Behandlung des Patulins; 3. Die Eichkurve. — B. Die Bestimmung der Patulinaufnahme. 1. Vorversuche; 2. Der Versuchsgang; 3. Besprechung der Versuche. — VI. Der Einfluß der Patulinvergiftung auf die Eigenatmung. 1. Methodisches; 2. Das allgemeine Atmungsbild bei Patulinvergiftung; 3. Der Einfluß der Patulinkonzentration auf die Eigenatmung und ihr Einfluß auf den Atmungsquotienten; 4. Über die Möglichkeit eines Abbaus des Patulins; 5. Der Einfluß des Glycogengehaltes der Hefe; 6. Verschiedenes; 7. Diskussion. — Schlußfolgerungen und Zusammenfassung — Diskussion — Zusammenfassung — Literaturverzeichnis.

*Les poisons entrent dans la composition*
*des remèdes ...* *La Rochefoucauld*

## Allgemeiner Teil

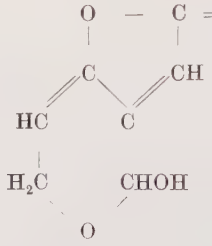
### I. Einleitung

Im Rahmen der Untersuchungen, die am Institut für spezielle Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule über Patulin ausgeführt worden sind und die hauptsächlich Transpiration, Welkeeffekt (d. h. Permeabilitätsfragen) oder Wachstum erfassen, schien es interessant, über den Stoffwechsel

der vergifteten pflanzlichen Zellen ein näheres Bild zu gewinnen. Da der Gaswechsel als wesentlichster Teil des erfaßbaren Stoffwechsels gute Anhaltspunkte liefern kann, wurde er untersucht. Dabei möchte ich Herrn Prof. Dr. E. GÄUMANN, Direktor des Institutes für spezielle Botanik an der E. T. H., für die Ermöglichung dieser Untersuchungen meinen besten Dank aussprechen. Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER, Vorsteher der Botanischen Anstalt der Universität Basel, der mir die Gelegenheit bot, die experimentellen Arbeiten durchzuführen, indem er mir den Arbeitsplatz und die notwendigen Apparaturen sowie bewährte Arbeitskräfte zur Verfügung stellte. Weiter danke ich den Herren Dr. HUBER und Dr. RIEDER von Basel herzlich für ihre Ratschläge und Frl. UEHLINGER für die Ausführung einiger Versuche.

## II. Literaturbesprechung

Das Patulin ist ein $\alpha$-$\beta$-ungesättigtes Lacton mit folgender Strukturformel:



Seine Synthese ist vor kurzem gelungen (WOODWARD and SINGH 1950). Da die Literatur über dieses Toxin sehr umfangreich ist, sollen hier nur einige Arbeiten von speziellem Interesse besprochen werden, wobei für zusammenfassende Literatur über Produktion, Konstitution, Chemismus und biologische Wirkung auf die Zeitschrift „Annual Review of Biochemistry" (bis Band 1951) sowie auf das Werk von FLOREY und Mitarbeiter „Antibiotics" (1949), das die bekannten Tatsachen bis 1947 zusammenstellt, hingewiesen sei. Ferner sei noch das von VOGEL (1951) herausgegebene Werk „Die Antibiotika" erwähnt.

Manche Autoren haben auf die Verschiedenheit der biologischen Wirkung des Patulins hingewiesen:

GÄUMANN, JAAG und BRAUN (1947) haben gezeigt, daß dieser Stoff bei Anwendung von Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,001 Mol. die Plasmaströmung der *Elodea canadensis* schon nach einigen Minuten schockartig aufhebt. Auch ein tierisches Objekt, *Paramaecium*, weist gleiche Symptome auf. Dieselbe Beobachtung machte MIESCHER (1950) mit *Tradescantia-* und *Allium*zellen. Das Patulin wirkt also sowohl auf pflanzliche wie auf tierische Zellen als Plasmagift.

Anderseits hat das Patulin eine wachstumshemmende Wirkung: Die Zellteilung von in vitro gezüchteten Bindegeweben wird noch bei einer Konzentration von $10^{-6}$ Mol. beeinflußt (KEILOVA-RODOVA 1949). SEILER (1951) hat bei Versuchen mit Maiswurzeln eine Wachstumshem-

mung festgestellt, die der Einwirkungsdauer des Giftes proportional ist. Bei Unterbrechung der Vergiftung wachsen die Wurzeln einige Zeit gehemmt weiter. JIROVEC (1949) untersuchte den Einfluß des Giftes auf einige Protisten und bestimmte dabei die letale Dosis in Abhängigkeit von der Einwirkungsdauer. Er bewies, daß bei Hemmungsversuchen (wo noch kein Tod erfolgt ist) die Zellen *(Euglena, Polytomella)* in Konzentrationen von 1 : 50 000 ohne morphologische Veränderung gehemmt weiterwachsen. Bei einer Konzentration von 1 : 20 000 ist alles Wachstum bei den genannten Organismen unterbunden. Zur Wirkung des Patulins auf Bakterien sei erwähnt, daß es sowohl grampositive wie gramnegative Organismen zu hemmen vermag (FLOREY et al. 1949). Weiter haben KATZMAN et al. (1944) herausgefunden, daß es auf *Rhizopus nigricans, Monilia albicans, Saccharomyces cerevisiae* und *Sporotrichum schenkii* antifungisch wirkt, hingegen auf *Aspergillus clavatus,* einen Patulinerzeuger, keinen Einfluß hat.

Zusammenfassend halten wir fest, daß das Patulin bei starken Konzentrationen tödlich wirkt, aber bei schwächeren Konzentrationen auch nur Teilschädigungen und Hemmungen hervorrufen kann.

Alle diese Feststellungen beweisen, daß das Patulin in bezug auf Organismen eine große unspezifische Wirkung besitzt. Da es laut allen Beobachtungen hemmende oder tötende Eigenschaften aufweist, ist zu erwarten, daß es auch auf den Gaswechsel hemmend einwirkt, steht dieser doch in enger Beziehung mit der plasmatischen Aktivität. Dieser Effekt — Hemmung der $O_2$-Aufnahme und $CO_2$-Abgabe — wurde in einer früheren unpublizierten Arbeit erzielt, wobei der Gaswechsel höherer Pflanzen (Tomatensproß, Kartoffel- und Randengewebe) nach der $CO_2$-Bestimmungsmethode von WILLSTÄTTER und STOLL (1918), verbessert durch GEIGER (1927), sowie an Hand der $O_2$-Bestimmungsmethode von DENNY (1947) untersucht worden ist. Es wurde dabei eine positive Korrelation zwischen Hemmung und Patulinkonzentration bzw. Gifteinwirkungsdauer festgestellt. Als Beispiel diene die Kurve in Abb. 1, aus welcher ersichtlich ist, daß nach einer zuerst raschen Hemmung der $CO_2$-Abgabe während zwei Stunden sich ein Gleichgewicht einstellt, das dann nur allmählich abnimmt.

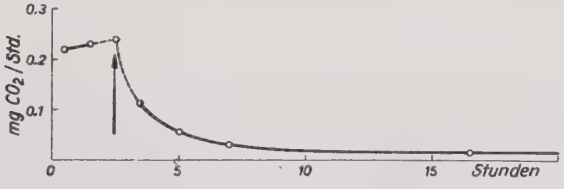



Abb. 1. Die Einwirkung des Patulins auf die $CO_2$-Abgabe von Randengewebe
Ordinate: $CO_2$-Intensität in mg pro Stunde.
Abszisse: Zeit in Stunden.
↑ Patulinzusatz ($10^{-2}$ Mol.)

In derselben Arbeit wurde auch an Hand eines Kriteriums, das die Zerstörung der Plasma-Semipermeabilität als Tod der Zelle betrachtet (GÄUMANN, JAAG und BRAUN 1947, GÄUMANN und VON ARX 1947), festgestellt, daß das Patulin zuerst hemmend, dann tötend wirkt: unter der Einwirkung einer $10^{-2}$ molaren Patulinlösung war 22 Stunden, bevor aus dem ständig

durchgeschüttelten Randengewebe Anthocyan austritt, eine Gaswechselhemmung feststellbar.

Da nun eine enge Beziehung zwischen Giftwirkung und Permeabilität der Zelle existiert, sollen hier die Arbeiten von GÄUMANN und Mitarbeiter erwähnt werden, die die semipermeabilitätszerstörenden Eigenschaften des Patulins besonders berücksichtigen und hervorheben.

GÄUMANN und JAAG (1947) zeigen, daß das Patulin den Wasserhaushalt der Tomatenpflanzen derart schädigt, daß es ein pathologisches Transpirationsbild hervorruft. Die Ursache ist bei der Zerstörung der Semipermeabilität der Pflanzenzellen zu suchen, wobei gebundenes Wasser in großer Menge frei wird und verdunstet, ohne daß die Pflanze einen Wassernachschub aufrechtzuerhalten vermag. MIESCHER (1950) konnte zeigen, daß vor allem die Zellen der Leitbündel geschädigt sind: das Patulin wirkt also unverzüglich auf die ersten Zellen, die es erreicht.

GÄUMANN, NAEF-ROTH, REUSSER und AMMANN (1952) erbrachten an Hand einer für die gegebenen Verhältnisse angepaßten Blattgewebestreifen-Methode von URSPRUNG (1923) einen eindeutigen Beweis für die Zerstörung der Semipermeabilität. Dabei ergab sich die Tatsache, daß die Konzentrationsschwelle der Patulinwirkung nach einer 24stündigen Einwirkung auf Tomatenblattgewebe sehr tief liegt (in der Größenordnung von $10^{-5}$ bis $10^{-6}$ molarer Patulinlösung). Die Wirkung scheint dabei die Folge einer chemischen Einwirkung auf das Plasma (siehe chemische Eigenschaften des Patulins) oder einer starken Adsorption des Giftes zu sein (wie etwa gewisse Narkotika). Gegen die letztere Hypothese spricht jedoch die tiefe Konzentrationsschwelle.

Über die chemischen Eigenschaften des Patulins berichten GEIGER und CONN (1945) sowie CAVALLITO und HASKEL (1945). Sie beweisen, daß Patulin (wie auch andere Antibiotika, insbesondere $\alpha$-$\beta$-ungesättigte Ketone und Lactone) durch Körper mit SH-Gruppen inaktiviert wird, wobei CAVALLITO und BAILEY (1944) die Irreversibilität solcher Reaktionen feststellten. MIESCHER (1950) schreibt: „Die Pflanze besitzt die Fähigkeit, eine bestimmte Menge Patulin (300 bis 400 mg pro kg Frischgewicht) zu inaktivieren." Dabei wird diese aber stark geschädigt. Weiter schreibt er: „Patulin, in möglichst großer Menge verabreicht, vermag in der Pflanze etwa 300 mg SH-Verbindungen (ausgedrückt als Cystein) je Kilogramm Frischgewicht zu blockieren, was ungefähr 50 % aller erfaßten Verbindungen betrifft." Eine Wirkung auf Fermente oder Fermentsysteme zeigen verschiedene Autoren. KARRER und VISCONTINI (1947) weisen ein Herabsetzen der Aktivität der Cocarboxylase bei der Brenztraubensäure-Vergärung durch Trockenhefe nach.

KREBS, zitiert in FLOREY et al. (1949), zeigt, daß $5.10^{-3}$ molare und höhere Patulinkonzentrationen eine Anzahl Enzyme (oxydative und andere) hemmen: „Urease, succinic dehydrogenase and the system responsible for the alcoholic fermentation in yeast, for the lactic acid formation in brain and muscles extracts and for the oxidation in brain and in heart-muscle."

Happold and Waters, zitiert in Florey et al. (1949), ergänzen noch folgendermaßen: „The following enzyme systems were completely inhibited by 1 mg of Clavatin per ml: Glucose dehydrogenase, succinoxidase, malic acid dehydrogenase, α-glycerophosphat dehydrogenase, tryptophanase. Other oxydative enzymes, including lactic acid dehydrogenase and d-amino acid oxidase, were said to be only partly inhibited, and little effect was observed on urease and cytochrome oxidase."

Wie aus der besprochenen Literatur hervorgeht, hat das Patulin eine sehr mannigfaltige unspezifische Wirkung.

## III. Fragestellung

Unsere Arbeit soll sich auf eine Erweiterung der Kenntnisse vom Wirkungsmechanismus des Patulins auf die lebende Zelle beschränken, mit besonderer Betonung folgender Fragen:

1. Wie gestaltet sich der Gaswechsel der Bäckerhefe unter dem Einfluß des Patulins?
2. Wie läßt sich eine chemische Einwirkung charakterisieren? Sind dabei Diffusions- oder Adsorptionswirkungen zu berücksichtigen?
3. Erfolgt eine Inaktivierung des Gaswechsels im Sinne einer unspezifischen Abtötung des Plasmas oder im Sinne einer spezifischen Wirkung direkt auf Fermentsysteme? Sind beide Möglichkeiten nachweisbar oder zu trennen?
4. Welche Beziehungen gibt es zwischen der Patulinaufnahme und ihrer Auswirkung auf den Gaswechsel?

# Experimenteller Teil

## I. Methodisches

### 1. Wahl des Versuchsobjektes

Als Testorganismus für die vorliegenden Versuche wurde Bäckerpreßhefe *(Saccharomyces cerevisiae)* verwendet. Sie stammte von der Hefefabrik Klipfel & Co., Rheinfelden, und wurde durch die Vermittlung einer Bäckerei zweimal pro Woche bezogen. Die Wahl fiel auf Preßhefe auf Grund der guten Beschaffungsmöglichkeit, ihrer Eignung für die Meßtechnik (Warburg) und weiter, weil der Hefestoffwechsel schon ziemlich gut erforscht worden ist. Außerdem ist Hefe, wie schon erwähnt (Katzman et al. 1944), empfindlich auf Patulin. Zudem ist zu bemerken, daß die Hefe, als einzelliger Organismus, Diffusionsnachteile, wie sie in Geweben höherer Pflanzen (Warburg 1926) vorkommen, ausschaltet und das Gift leicht Zutritt hat.

### 2. Wahl der Apparatur

Die Versuche wurden mit einer Apparatur durchgeführt, für deren Einzelheiten und Beschreibung der Technik wir auf Warburg (1926) verweisen, sowie auf Dixon (1943) und Umbreit, Burris and Stauffer (1949). Anfäng-

lich verfügten wir über sechs Manometer. Durch Anschaffung einer neuen Apparatur (Firma Braun, Melsungen) konnten bei einigen späteren Versuchen noch weitere 14 Manometer verwendet werden.

### 3. Herkunft des Patulins

Das verwendete Patulin wurde in folgenden Instituten hergestellt:

Institut für spezielle Botanik der E. T. H. (hergestellt von Herrn Dr. H. KERN) — Smp. 108 bis 109 ° C.

Institut für spezielle Botanik und organisch-chemisches Institut der E. T. H. (aufgearbeitet von Herrn Dr. A. BOLLER) — Smp. 108 bis 109,5 ° C.

Botanische Anstalt der Universität Basel (hergestellt von Frl. H. ZÜRCHER) — Smp. 108 bis 109 ° C.

Da die Literatur den Smp. zwischen 109 ° und 111 ° C festlegt, können sämtliche Proben als genügend rein betrachtet werden.

### 4. Die Meßgenauigkeit

Da die Meßgenauigkeit bei der WARBURG'schen Methode besonders von der Temperaturkonstanz abhängt, war es angebracht, letztere einer eingehenden Prüfung zu unterziehen. Die bei 24 ° C durchgeführten Versuche haben Schwankungen von durchschnittlich ± 0,007 ° C ergeben, wobei die höchst beobachteten Abweichungen 0,05 ° C nicht überstiegen. Diese Genauigkeit genügt ohne weiteres.

Die Manometergefäßkonstante wurde pro Gefäß je dreimal bestimmt. Gefäße und Manometerkapillaren wurden mit Quecksilber kalibriert. Aus dem so erhaltenen Volumen ließ sich die Konstante nach folgender Formel berechnen (WARBURG 1926):

$$K = \frac{VG \cdot \frac{273}{T} + VF \cdot \alpha}{10\,000}$$

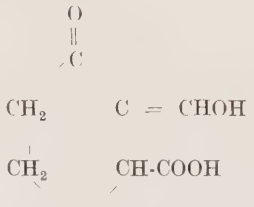
wobei: VG = Gasvolumen
T = Temp. abs.
VF = Flüssigkeitsvolumen
$\alpha$ = Absorptionskoeffizient des $O_2$ resp. des $CO_2$ in Wasser.

Als Sperrflüssigkeit diente BRODIEsche Lösung, die von Zeit zu Zeit erneuert wurde. Auch hier war die erzielte Genauigkeit befriedigend; bei zweckmäßigen Schüttelfrequenzen und Amplituden kann ein Versuchsfehler von ± 5 % eingehalten werden, wobei die durch Abfüllen der Gefäße, Schwankungen in der Hefesuspension und Ablesung der Resultate entstandenen Fehlerquellen inbegriffen sind.

### 5. Über die Veränderlichkeit der Patulinlösungen

Eine Patulinlösung verändert sich unter gewissen Bedingungen. So schreibt z. B. FLOREY et al. (1949): „Expansine was found to be inactivated by an

enzyme, present in serum, liver and kidney, which probably opens its lactone ring to give:



This is interesting, because $\gamma$-lactones are usually stable to liver and serum enzymes."

Brzeski (1949) bemerkt: „Bei der Behandlung mit einem Überschuß an kalter 0,1 n Natronlauge verbraucht sie (die Substanz) aber zwei Aequivalente Alkali. Die Lösung färbt sich dabei gelb...." — „Nach dem Ansäuren läßt sich kein Patulin mehr daraus zurückgewinnen." Daraus läßt sich die Beobachtung Keilova-Rodova's (1949) ohne weiteres ableiten, daß „nach dreitägiger Erwärmung der Patulinlösung (pH = 7,2) im Thermostaten auf 37° C die Toxizität vermindert wird." Versuche, in welchen das pH größer als 7 ist, verlangen deshalb eine sehr vorsichtige Arbeitsweise. Bei einem elektrometrischen Titrationsversuch mit Glaselektroden entsprach dem Säureast der Kurve ein asymmetrischer alkalischer Ast. Bei pH-Werten von 9,7 und mehr sinkt das pH einige Zeit nach der Laugenzugabe unter Gelbfärbung der Lösung. Zum Beispiel: zehn Minuten nach Laugenzusatz hat sich der pH-Wert von anfänglich 9,9 auf 9,6 herabgesetzt und in 45 Minuten von 10,3 auf 9,1. Unter einem pH-Wert von 9,7 scheint jedoch die Hydrolyse sehr langsam vor sich zu gehen, so daß bei kurzfristigen Versuchszeiten Werte zwischen 7,0 und 9,0 gut verwendet werden können.

Nach Baron (1950) verursachen folgende Stoffe beim Zusatz zu einer Patulinlösung unter Gelbfärbung einen Aktivitätsverlust: verd. Ammoniak, Piperidin, Asparagin, Amino-Säuren und Peptone. Wahrscheinlich verursachen alle eine Öffnung des Lactonringes oder gehen mit Patulin eine Verbindung ein. Die Patulinlösungen wurden immer frisch hergestellt und in höchstens dreitägigen Versuchsreihen verwendet, denn wir stellten fest, daß ungepufferte, alternde Lösungen ihre Aktivität einbüßen, wie aus folgendem ersichtlich ist:

*Tabelle 1*

Der Aktivitätsverlust alternder Patulinlösungen

| Hemmung der $O_2$-Aufnahme der Hefe in % (Mittelwert aus 4 Messungen) | | |
|---|---|---|
| | frische Lösung | 45-tägige Lösung |
| Patulin $5.10^{-3}$ Mol. ..... | 92,4 % | 84 % |
| Patulin $2{,}5.10^{-3}$ Mol. ..... | 77,1 % | 68,6 % |

Parallel zur Alterung wird die Lösung gelb und fluoreszierend; der pH-Wert sinkt wie folgt:

*Tabelle 2*

Die Eigenschaften einer Patulinlösung in bezug auf Alter, pH und Fluoreszenz

| Alter einer $10^{-1}$ molaren Lösung | pH | Fluoreszenz in % (siehe S. 244) |
|---|---|---|
| 0 Tage | 4,45 | 0 |
| 2 Tage | 3,65 | 1 |
| 47 Tage | 2,68 | 18 |

Aktivitätsverlust und Sinken des pH-Wertes deuten auf die bereits erwähnte Öffnung des Lactonringes hin.

## 6. Vorbehandlung der Hefe

Die frisch bezogene Hefe wurde stets im Dunkeln aufbewahrt (RIEDER 1951), vor Versuchsbeginn in dest. Wasser gewaschen, um sie von eventuell anhaftender Nährlösung zu befreien, dann abzentrifugiert oder abgenutscht und in der gewünschten Dichte suspendiert (nephelometrische Kontrolle nach MUSFELD 1942). Je nach der Versuchsreihe kamen 2 ‰ige bis 20 %ige Suspensionen in Frage, die vor Verwendung zwecks Befreiung von Glycogen eine Nacht lang bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurden (ALTHAUS 1950), mit Ausnahme der Suspensionen hoher Dichten, die geschüttelt werden mußten. Da die Hefe außerdem mit der Zeit ihre Aktivität verliert, wurden die Suspensionen alle drei Tage neu hergestellt. Im Rahmen unserer Versuche haben wir festgestellt, daß die Aufbewahrung im Kühlschrank (3 ° C) gegenüber derjenigen bei Zimmertemperatur keine Differenzen aufweist. Auch das wiederholte Abzentrifugieren bleibt ohne Einfluß, im Gegensatz zu Bierhefe, bei welcher gewisse Fermente lockerer gebunden sind.

Zur Aktivität und Patulinempfindlichkeit der verschiedenen Hefesendungen ist zu bemerken, daß ziemlich starke Unterschiede auftreten können. Dies mag mit dem fabrikationsmäßigen Züchtungsverfahren (Alter der Nährlösung) und der Lagerung in Zusammenhang stehen (WARBURG 1928, ALTHAUS 1950 und RIEDER 1951). Deshalb wurden die Versuchsreihen nach drei Tagen abgeschlossen, wenn nicht der Alterungseffekt willkürlich hervorgehoben werden sollte. Vergleiche zwischen verschiedenen Versuchsreihen konnten also nur dann gezogen werden, wenn die Zahl der Versuche ausreichte, um in den Bereich der statistischen Berechnungen zu gelangen, was zum Beispiel bei der Prüfung des Konzentrationseinflusses der Fall ist.

## 7. Mittelwerte und Streuungen

Wir bezeichnen mit $\sigma$ die Standardabweichung der Einzelwerte:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\Sigma \Delta^2}{(n-1)}}$$

und mit $\sigma m$ die Standardabweichung der Mittelwerte:

$$\sigma m = \sqrt{\frac{\Sigma \Delta^2}{n(n-1)}}$$

wobei n = Anzahl der Werte
$\Delta$ = Abstand der Einzelwerte vom Mittelwert $\bar{M}$.

## II. Das Absterben der Hefezellen unter der Einwirkung des Patulins

In der Einleitung haben wir an Hand des Randentestes auf das Absterben der Zellen hingewiesen und dabei festgestellt, daß der Tod ziemlich spät nach dem Eintreten einer Hemmung erfolgt. Es erhebt sich nun die Frage nach dem Zeitpunkt des Absterbens der Hefezelle; denn es muß abgeklärt werden, ob bei unseren Versuchsbedingungen mit diesem Faktor zu rechnen ist.

Musfeld (1942) bestimmte die Anzahl toter Zellen mit einer Methylenblaulösung von 1 : 10000, wobei zu bemerken ist, daß, da Methylenblau ein Vitalfarbstoff ist, nach Strugger (1948) „die toten Zellen eine sehr starke Plasmafärbung aufweisen, die lebenden Zellen höchstens eine blaßblaue Vakuolenfärbung besitzen". Der Prozentsatz an toten Zellen ist sehr klein und durch das Alter der Hefe bedingt. Im allgemeinen war das Verhältnis bei frischen Suspensionen etwa $< 1\,\%$. Die Anwendung dieser Methode auf mit Patulin vergiftete Zellen gab folgende Resultate (für jeden Einzelwert wurden 200 bis 300 Zellen mikroskopisch untersucht):

*Tabelle 3*

Bestimmung der mit Methylenblau färbbaren Zellen nach der Patulinvergiftung

Wäßrige Methylenblaulösung = 1 : 5000
Hefesuspensionsdichte = 2 ‰

| Zeit in Stunden nach Patulinzusatz | % gefärbter Zellen | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Patulinkonz: | $10^{-2}$M. | $5.10^{-3}$M. | $10^{-3}$M. | Kontr. |
| 1 | | 1 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | | 5 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | | 70 | 15 | 8 | 1 |

In diesem Prozensatz sind inbegriffen:

— eine kleine Anzahl Zellen, bei welchen eine starke Plasmafärbung auftrat;
— eine größere Anzahl Zellen, die nur eine starke Vakuolenfärbung aufwiesen.

Diese Ergebnisse sind zu wenig eindeutig, und der Test wurde nach Angaben von Fink und Kühles (1933) wiederholt, die unter Anwendung einer auf einen pH-Wert von 4,6 gepufferten Methylenblaulösung von folgender Zusammensetzung gearbeitet haben:

100 cm³ wäßrige Methylenblaulösung 1 : 5000;
99,75 cm³ Mol./5 primäres Kaliumphosphat;
0,25 cm³ Mol./5 sekundäres Kaliumphosphat.

Mit dieser Methode erreichten wir folgende Ergebnisse:

*Tabelle 4*

Bestimmung der toten Hefezellen

Hefesuspensionsdichte: a) 2 ‰, b) 2 %

| | Zeit in Stunden nach Patulinzusatz | % gefärbter Zellen | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Patulinkonz. molar | $10^{-3}$ | $5.10^{-3}$ | Kontrolle |
| a) | 1 | | 1 | 1 | 0 |
| | 2 | | 0,6 | 0,4 | 0,6 |
| | 4 | | 0,4 | 1,3 | 0 |
| b) | 1 | | 1,6 | | 0,6 |
| | 2 | | 0,2 | | 2 |
| | 4 | | 1,2 | | — |
| | 7 | | 2 | | 0,2 |

Die durch Kochen abgetöteten Zellen weisen alle eine Plasmafärbung auf.

Aus den angeführten Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

a) In der normalen Versuchszeit, die nur selten über sieben Stunden dauert, ist das Absterben der Zellen unbedeutend.

b) Es besteht zwischen Plasma- und Vakuolenfärbung unter Patulineinwirkung eine Diskrepanz, die vom umgebenden pH abhängig ist.

Die Interpretation dazu könnte lauten: beim gepufferten Farbstoff vermag das lebende Material (Plasma und Vakuolenbestandteile) die Farbe nicht zu speichern. Dagegen besitzt totes Plasma, wenn auch nur in geringem Ausmaß, diese Eigenschaft, da das pH der Lösung bei einem Wert von 4,6 in die Nähe des isoelektrischen Punktes denaturierter Eiweiß-Körper gelangt. Bei höherem pH-Wert kann eine Permeabilitätserhöhung der Zelle eine Beschleunigung der Färbung des Vakuoleninhaltes lebender Zellen verursachen, was mit der permeabilitätserhöhenden Wirkung des Patulins übereinstimmen würde.

Vielleicht löst das Patulin dank seiner Eigenschaft, sich mit SH-Gruppen zu verbinden, die Schwefelbrücken der Grenzflächenproteine auf, um somit eine Permeabilisierung herbeizuführen, ohne daß dadurch das Plasma unmittelbar abstirbt.

Die Methylenblaufärbung muß jedoch äußerst kritisch betrachtet werden, da dieser Farbstoff unter Umständen in der Zelle reduziert werden und in die Leukoform übergehen kann.

Ein eingehendes Studium der Frage des Absterbens würde aber den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

## III. Einfluß des Patulins auf die Glucoseatmung und Gärung

### 1. Methodisches

Die Hefe wurde in Mol./15 primärem Phosphatpuffer (GEIGER-HUBER 1934) oder in dest. Wasser suspendiert. Es konnten in diesen beiden Suspensionsmitteln keine Unterschiede in bezug auf die Gaswechselintensität der Hefe festgestellt werden, doch mußten bei pH-Versuchen natürlich entsprechende Puffer gewählt werden. Die Suspensionsdichte betrug normalerweise 2 ‰, in einzelnen Fällen auch 3, 4 oder 8 ‰. Jedes Versuchsgefäß erhielt 2,4 $cm^3$ Suspension in den Hauptraum. Der Glucosezusatz bestand aus 0,3 $cm^3$ 10 %iger Lösung, und der Giftzusatz war auf 0,3 $cm^3$ bemessen. Glucose und Patulin wurden entweder sofort, d. h. vor dem Einstellen der Gefäße in den Schüttelthermostaten, beigemischt, oder in die Anhänge gegeben, wo sie dann im gewünschten Moment während des Versuchsablaufes in die Hefesuspension eingekippt werden konnten. Bei $O_2$-Messungen wurde der Einsatz zwecks Absorption der gebildeten Kohlensäure mit 0,5 $cm^3$ 5 %iger KOH ergänzt, zur $CO_2$-Bestimmung dagegen nur mit dest. Wasser. Die gleichzeitige Bestimmung der $O_2$- und $CO_2$-Werte erfordert die Verwendung von je zwei gepaarten Gefäßen. Die Berechnung der Werte (Verbrauch des $O_2$ oder der Abgabe des $CO_2$) geschah nach folgender Formel (GEIGER-HUBER 1934):

$$XO_2\ (mm^3) = h' \cdot K_{O_2} \qquad XCO_2\ (mm^3) = (h'' - h') \cdot K_{CO_2}$$

wobei: $h', h''$ = Differenz zwischen Druck in der Zeit t und Anfangsdruck in Manometerskalenteilen;
$K$ = Gefäßkonstante für $O_2$ resp. $CO_2$.

Die zweite Formel ist anwendbar, wenn das Volumen der zwei entsprechenden Gefäße für $O_2$ und $CO_2$ gleich ist, was durch Zusatz von Glasstäbchen erzielt wurde. Die Temperatur- und Druckschwankungen wurden mittels eines nur dest. Wasser enthaltenden Manometers festgestellt und zur Korrektur der $O_2$- und $CO_2$-Werte in die Berechnung einbezogen. Die Ablesungen erfolgten in Abständen von 15, 20 oder 30 Minuten. Nach dem Auffüllen wurden die Gefäße in den Schüttelthermostaten gebracht und einer 15 bis 60 Minuten dauernden Vorperiode ausgesetzt, um den Temperaturausgleich und die Anpassung der Hefe an die neuen Bedingungen zu ermöglichen. Die Darstellung der Resultate erfolgte summarisch, d. h. jeder Wert gibt die seit Meßbeginn total aufgenommene $O_2$-Menge oder abgegebene $CO_2$-Menge in $mm^3$ an. Die Hemmung wurde in % des parallelen Kontrollwertes der nicht vergifteten Hefe ausgedrückt, d. h.:

$$H\,\% = \frac{100 \cdot (K - R)}{K}$$

wobei: $K$ = Atmungsintensität der unbeschädigten Zellen in $mm^3$/Zeit (Kontrolle);
$R$ = Atmungsintensität der vergifteten Zellen in $mm^3$/Zeit (Restatmung);
$K - R$ = Atmungsintensitätsverlust (Hemmung).

Da bei den verwendeten Suspensionsdichten die Eigenatmung (ohne Glucose) in bezug auf die Glucoseatmung und -Gärung sehr minimal ist (etwa 100mal kleiner), wurde sie vernachlässigt.

## 2. Das Atmungs- und Gärungsbild der vergifteten Hefe

Abb. 2 stellt eine Kurve der $O_2$-Aufnahme dar. Die Glucose wurde eineinhalb Stunden vor, das Patulin 30 Minuten nach Meßbeginn zugegeben. Die Giftkonzentration betrug $10^{-2}$ Mol., $5.10^{-3}$ Mol. und $10^{-3}$ Mol., die Temperatur 30° C und die Suspensionsdichte 2 ‰. Wir haben im Verlauf der Kurven nach der Patulinzugabe zwei Phasen zu unterscheiden:

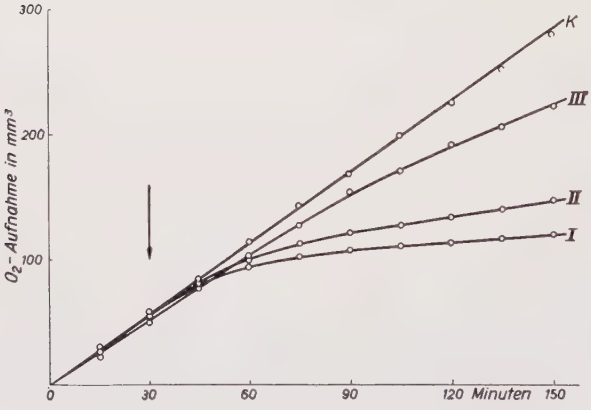



Abb. 2.
Der Einfluß des Patulins auf die Glucoseveratmung der Hefe
Ordinate: $O_2$-Aufnahme in $mm^3$
Abszisse: Zeit in Minuten
↓ Patulinzusatz (nach Glucose)
Kurve K = Kontrolle
Kurve I = Patulin $10^{-2}$ Mol.
Kurve II = Patulin $5.10^{-3}$ Mol.
Kurve III = Patulin $10^{-3}$ Mol.

1. Phase: eine rasche Hemmungszunahme während etwa einer Stunde, d. h. ein rasches Abbiegen der Kurven von der Kontrollkurve;

2. Phase: die Einstellung der Atmungsintensität auf eine Gleichgewichtsgeschwindigkeit, die konzentrationsabhängig ist.

In der Darstellung kommt es in den verschiedenen Steigungen der Kurven zum Ausdruck.

Die Kurven der Abb. 3 und 4 sind die Ergebnisse eines Versuchs, in welchem Patulin in Konzentrationen von $5.10^{-3}$ Mol. und $10^{-2}$ Mol. etwa eine Stunde vor, die Glucose 30 Minuten nach Meßbeginn zugegeben wurden. Unter sonst gleichen Bedingungen, wie beim Versuch der Abb. 2, läßt sich eine analoge Konzentrationsabhängigkeit für $O_2$-Aufnahme und $CO_2$-Abgabe feststellen.

Nun stellt sich die Frage nach der Verschiebung der „Gleichgewichtsphase" bei längerer Einwirkungszeit des Giftes. Ist das nach einiger Zeit eintretende Gleichgewicht für die verschiedenen Konzentrationen stabil oder folgt eine langsam zunehmende Drosselung des Gaswechsels?

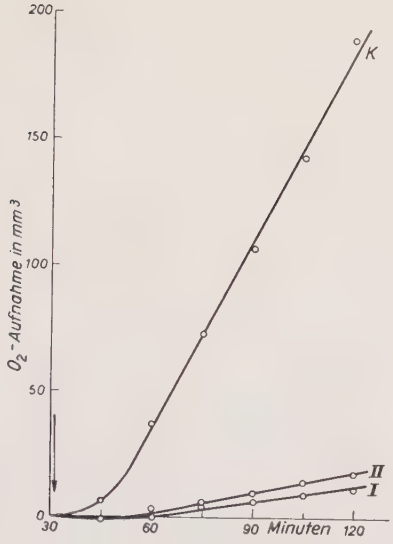



Abb. 3. Der Einfluß des Patulins auf die $O_2$-Aufnahme

Ordinate: $O_2$-Aufnahme in mm³

Abszisse: Zeit in Minuten

↓ Glucosezusatz (nach Patulin)

Kurve K = Kontrolle
Kurve I = Patulin $10^{-2}$ Mol.
Kurve II = Patulin $5.10^{-3}$ Mol.

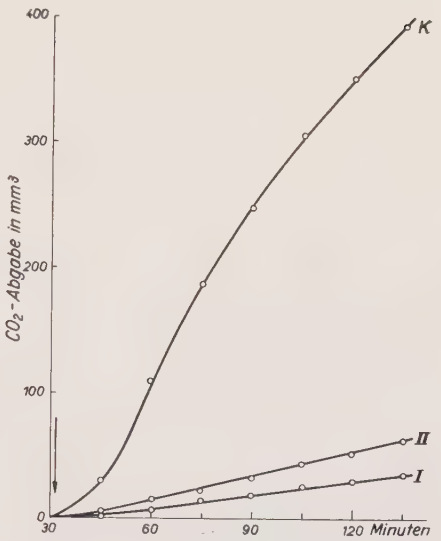



Abb. 4. Der Einfluß des Patulins auf die $CO_2$-Abgabe

Ordinate: $CO_2$-Abgabe in mm³

Abszisse: Zeit in Minuten

↓ Glucosezusatz (nach Patulin)

Kurve K = Kontrolle
Kurve I = Patulin $10^{-2}$ Mol.
Kurve II = Patulin $5.10^{-3}$ Mol.

Die Antwort auf diese Frage gibt Abb. 5, aus welcher ersichtlich ist, daß die Hemmung dauernd leicht zunimmt (0,6 bis 1,6 % pro Stunde). Das bedeutet, daß nach einer raschen Zunahme der Hemmung (1. Phase) bald darauf eine langsame erfolgt (2. Phase), wie wenn zuerst eine Oberflächenbesetzung, gefolgt von einem langsamen Eindringen in die Zelle hinein stattfinden würde.

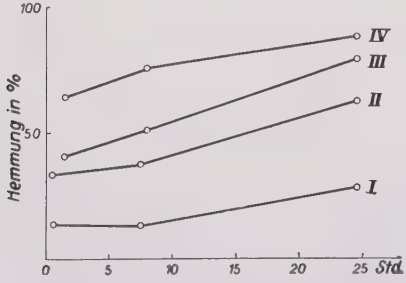



Abb. 5. Die Zunahme der Hemmung der $O_2$-Aufnahme bei langdauernder Einwirkung des Patulins

Ordinate: Hemmung der $O_2$-Aufnahme in %

Abszisse: Patulineinwirkungsdauer in Stunden

Kurve IV: Patulin $10^{-3}$ Mol. Mittlere Hemmung pro Stunde = 1,2 %
Kurve III: Patulin $5.10^{-4}$ Mol. Mittlere Hemmung pro Stunde = 1,6 %
Kurve II: Patulin $2{,}5.10^{-4}$ Mol. Mittlere Hemmung pro Stunde = 1,2 %
Kurve I: Patulin $10^{-4}$ Mol. Mittlere Hemmung pro Stunde = 0,6 %

Weitere Versuche für den Gaswechsel ergaben stets das gleiche Bild. Da das Patulin beide Vorgänge — Glucoseatmung und -Gärung — gleichmäßig hemmt und sie nicht trennt, sind zwei Hypothesen möglich:

a) Das Patulin blockiert ein oder mehrere Atmungsfermente, über welche sowohl die $O_2$-Aufnahme wie die $CO_2$-Abgabe verlaufen.

b) Das Gift lähmt allgemein (unspezifisch) das Plasma und seine Tätigkeit (Verminderung der Vitalität). Dies kann durch die chemische Verbindung mit Körpern, die für das Plasma lebenswichtig sind, oder durch Adsorption, d. h. durch Besetzung der aktiven Bezirke, geschehen.

Es werden bei der Charakterisierung verschiedener Einflüsse auf die Vergiftung der Glucosevergärung immer Werte verglichen, bei denen das sogenannte „Gleichgewichtsstadium" soeben eingetreten ist, d. h. zum Beispiel nach Abb. 2 $O_2$- (bzw. $CO_2$-)Werte von der 60. bis zur 120. bzw. 150. Minute nach Patulinzusatz. Aus diesen Werten wird die eingetretene Hemmung errechnet.

### 3. Der Einfluß der Suspensionsdichte

Um die Veränderung der ursprünglichen Patulinkonzentration in den Atmungsgefäßen (infolge Aufnahme durch die Hefe) zu untersuchen, wurden verschiedene Suspensionsdichten im Bereich von 2 bis 8 ‰ verwendet. Die durch Patulinkonzentrationen von $10^{-3}$ Mol., $2.10^{-3}$ Mol. und $2{,}5.10^{-3}$ Mol. erzielte Hemmung wurde an Hand der $O_2$-Werte gemessen. Die prozentuale Hemmung war für jede Konzentration im Rahmen der 5 %igen Versuchsfehlergrenze dieselbe, und zwar unabhängig von der Suspensionsdichte, was angesichts der geringen Hefemenge, die sich in solchen Suspensionen befindet, verständlich ist. Die Patulinkonzentration darf also während eines Versuchs als Konstante betrachtet werden.

### 4. Die Abhängigkeit der Hemmung von der Giftkonzentration

Die Darstellung beschränkt sich auf die $O_2$-Hemmung, da die $CO_2$-Abgabe wiederum in analoger Beziehung dazu steht. Bei der Annahme, daß die Wirkung des Patulins eine chemische ist und daß die Hefe mit ihren reaktionsfähigen Stoffen einheitlich als chemischer Körper betrachtet werden kann, sollte für den Einfluß der Giftkonzentration das Massenwirkungsgesetz anwendbar sein. Dabei haben wir folgende Daten:

A = Konzentration des die Hefe umspülenden Patulins, die sich während des Versuchs nicht merkbar verändert;
B = unbekannte Konzentration der in der Hefe reagierenden Stoffe;
AB = Reaktionsprodukt.

Das Massenwirkungsgesetz ergibt für den Gleichgewichtszustand:

$$(1) \qquad \frac{[A \cdot B]}{[A] \cdot [B]} = K \qquad \text{oder} \qquad \frac{[A \cdot B]}{[B]} = K \cdot [A]$$

Bezeichnet man mit H (Hemmung in %) die Menge des gebildeten Stoffes AB und mit (100 — H) die Menge des Stoffes B, d. h. der Stoffe,

die die $O_2$-Aufnahme noch bewirken können (Atmungsrest), so ergibt sich aus (1):

$$\frac{H}{100 - H} = K \cdot [A] \qquad (2)$$

Für jede Patulinkonzentration A ist die Hemmung H experimentell meßbar.

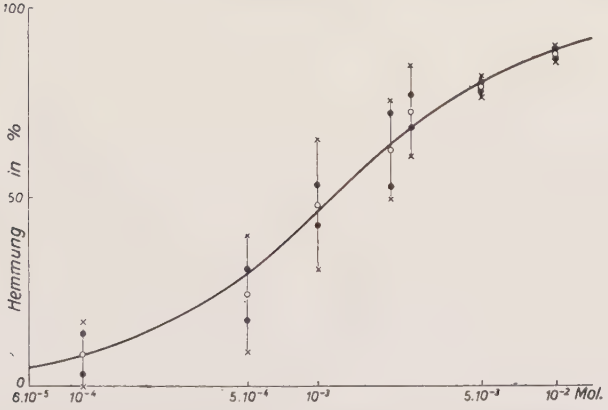



Abb. 6. Die Hemmung der $O_2$-Aufnahme in Abhängigkeit von der Patulinkonzentration
Ordinate: Hemmung der $O_2$-Aufnahme in %
Abszisse: Patulinkonzentration in Mol. (logarithmisch)
○ Mittelwert der Einzelmessungen
● Abweichung $\sigma m$ der Mittelwerte
× Abweichung $\sigma$ der Einzelwerte
Kurve: berechnet (siehe Text)

Die graphische Darstellung in Abb. 6 stellt die aus 17 Versuchen gewonnenen Ergebnisse zusammen. Die Versuche wurden in einer Periode von etwa eineinhalb Jahren ausgeführt. Die Versuchstemperatur aller Versuche betrug 30° C und die Suspensionsdichte 2 ‰ (ein Versuch 3 ‰). Der Meßabschnitt begann frühestens in der 30. Minute und endete spätestens in der 180. Minute nach der Patulinzugabe. Aus dieser Figur ist ersichtlich, daß die theoretische Kurve, die den Verlauf der Massenwirkungsgesetzformel (2) wiedergibt, sehr ähnlich wie die Mittelwertskurve der $O_2$-Hemmung jeder Konzentration verläuft. Tatsächlich zeigt die statistische Prüfung (Fisher, 1946, Z-Test), daß die Abweichungen der experimentellen Werte von der theoretischen Kurve nicht signifikant sind. Dies kann durch einen Vergleich der Streuung ($S_1$) der Mittelwerte um die hypothetische Kurve mit der Streuung ($S_2$) der Einzelmessungen um ihren Mittelwert nachgewiesen werden.

$$S_1 = \frac{\Sigma D^2}{m - 1}$$ wobei m = Anzahl der Mittelwerte,
D = Abstand eines Mittelwertes von der Kurve.

$$S_2 = \frac{\Sigma d^2}{n - m}$$ wobei d = Abstand des einzelnen Meßwertes von seinem Mittel,
n = Anzahl Einzelmessungen.

Ist $S_2$ größer als $S_1$, dann ist die Übereinstimmung besser, als im Mittel zu erwarten ist, wenn die Abweichungen der Mittelwerte von der Kurve bloß eine Folge der Streuung der Einzelwerte sind. Im vorliegenden Fall trifft dies zu, und zwar ist $e^{2z} = \frac{S_1}{S_2} = 2{,}234$: eine so gute oder noch bessere Übereinstimmung zwischen experimentellen Werten und Hypothese tritt in etwa 17 % aller Fälle auf.

Die Konstante wurde aus den Mittelwerten der einzelnen Versuche berechnet und beträgt $M \pm \sigma m = 885 \pm 69$. Damit ist nachgewiesen worden, daß die Experimente mit der vorausgesetzten Hypothese im Einklang stehen.

Die große Streuung in diesen Versuchen ist durch die Hefe bedingt und entspricht den auf Seite 228 erwähnten Faktoren (Züchtungsbedingungen der Hefe, usw.)

RUNNSTRÖM und SPERBER (1938) beobachteten eine analoge Tatsache für die Fluoridhemmung. Sie schreiben: „Es kann nicht exakt angegeben werden, wo die Grenzkonzentration der Hemmung für die intakte Bäckerhefe liegt; dieselbe variiert, abhängig von der Vorgeschichte der Hefe, ziemlich stark." Eine eventuell stattfindende Adsorption hat auf das Hemmungsbild keinen Einfluß, weil sich sonst dem chemischen Gesetz ein Adsorptionsgesetz überlagern sollte. Fragen über die aufgenommene Patulinmenge und die Möglichkeit eines Diffusionseffektes (Entgegenwirkungen der Plasmagrenzschicht gegen das Eindringen des Patulins), sowie die Einwirkung auf die Atmungsfermente werden weiter unten besprochen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die Patulineinwirkung chemischer Natur ist. Dies wird auch durch die im nächsten Abschnitt besprochenen Versuche bestätigt.

### 5. Der Temperatureffekt

GÄUMANN (1951) konnte nachweisen, daß eine der Pflanze zugegebene bestimmte Menge Patulin bei steigender Temperatur einen ebenfalls steigenden Welkeeffekt hervorruft. Laut Hinweis des Autors sind in diesem Falle die Verhältnisse ziemlich kompliziert, da nicht mit Einzelzellen, sondern mit einer ganzen Pflanze gearbeitet wurde.

In welchem Verhältnis bleibt das Patulin im Zellsaft zurück? Wie und in welcher Form gelangt das Gift zu den Einzelzellen? Wie verändern sich die Zellen mit der Temperatur? Das sind alles Fragen, die bei Experimenten an Pflanzen schwer zu beantworten sind.

Bei der vorliegenden Untersuchung sind die Verhältnisse ebenso kompliziert; denn 1. sind die Vorgänge (Atmung und Gärung) selbst temperaturbedingt; 2. ist die chemische und physikalische Beschaffenheit des Plasmas je nach Temperatur verschieden (Diffusion, Struktur und Proteinveränderung usw.); 3. ist neben der Reaktionsgeschwindigkeit des Patulins auch seine Reaktionsfähigkeit von der Temperatur abhängig; 4. findet eine Verschiebung der Reaktionsgleichgewichte statt. Alle diese Faktoren wirken sich auf den Temperaturkoeffizienten aus. Deshalb ist eine so deutlich mathematische Beziehung, wie sie im vorherigen Abschnitt dank der konstanten Milieubedingungen vorhanden war, kaum zu erwarten, und wir beschränkten uns auf folgende Experimente:

a) Die Hefe wird bei einer gegebenen Temperatur in der Patulinlösung geschüttelt, dann abzentrifugiert, um einen weiteren Giftnachschub zu verhindern. Darauf erfolgt die Prüfung der $O_2$-Aufnahme bei verschiedenen

Temperaturen. Hat indessen eine bestimmte Menge Patulin chemisch reagiert, so ist bei allen Temperaturen eine gleichmäßige prozentuale Hemmung zu erwarten, unter der Annahme, daß ein Teil des Plasmas oder der Fermente inaktiviert worden ist und daß durch das Abzentrifugieren kein reaktionsfähiges Patulin mehr an der Zelle haften blieb. Tabelle 5 bestätigt diese Annahme:

*Tabelle 5*

Prüfung der $O_2$-Aufnahme bei verschiedenen Temperaturen

Hefe 3 ‰, eine Stunde in Patulinlösungen von $2{,}5.10^{-3}$ Mol. und $10^{-3}$ Mol. geschüttelt, abzentrifugiert, in dest. Wasser suspendiert

| Temperatur der Warburg-Apparatur | Patulinkonzentration | |
|---|---|---|
| | $2{,}5.10^{-3}$ Mol. | $10^{-3}$ Mol. |
| | % H | % H |
| 20° C | 74,7 | 42,6 |
| 30° C | (64) | 39,7 |
| 40° C | 71,3 | 40,5 |

Die Ergebnisse sind im Versuchsfehler von etwa ± 5 % enthalten

b) Sollte nach dem Auswaschen noch anhaftendes oder eingedrungenes Patulin reagieren können, so müßte eine zusätzliche temperaturabhängige Wirkung wahrnehmbar sein, wenn die Hefe während einer kurzen Zeitspanne in verschiedene Temperaturen gebracht wird. Tabelle 6 widerlegt diese Hypothese:

*Tabelle 6*

Hemmung der $O_2$-Aufnahme

Hefe 3 ‰, eine Stunde bei 21° C in Patulinlösung $2{,}5.10^{-3}$ Mol. geschüttelt, abzentrifugiert, in dest. Wasser suspendiert, während 45 Minuten in Thermostaten von 15, 30 und 45° C versetzt. Prüfung der $O_2$-Aufnahme bei 25° C

| Aufbewahrungstemperatur | 15° C | 30° C | 45° C |
|---|---|---|---|
| Hemmung in % | 46,3 | 45,5 | 50 |

c) Die Hefe wurde bei verschiedenen Temperaturen gleich lang geschüttelt, abzentrifugiert und bei einer gegebenen Temperatur untersucht. Hier ist die Temperaturabhängigkeit der $O_2$-Aufnahme ausgeschaltet. Wenn die Patulinfixierung von der Temperatur abhängig ist, so muß die Hemmung laut chemischer Gesetzmäßigkeit gegenüber der Kontrolle prozentual verschieden sein, was aus der Tabelle 7 klar ersichtlich ist:

*Tabelle 7*

Hemmung der $O_2$-Aufnahme

Vorbehandlung siehe Text. Hefe 3 ‰, zwei Stunden bei 20, 30 und 40° C in Patulinkonzentrationen von $2{,}5.10^{-3}$ Mol. und $10^{-3}$ Mol. geschüttelt, abzentrifugiert, in dest. Wasser suspendiert. Prüfung der $O_2$-Aufnahme bei 30° C

| Patulinkonzentration | Temperatur des Schüttelbades | | |
|---|---|---|---|
| | 20° C | 30° C | 40° C |
| $2{,}5.10^{-3}$ Mol. | 50 % H | 60 % H | 89 % H |
| $10^{-3}$ Mol. | 21 % H | 31 % H | 69 % H |

Es wurde absichtlich mit mittleren, d. h. mit solchen Konzentrationen gearbeitet, bei denen sich das Gleichgewicht der Hemmung im mittleren Kurvenstück befindet (siehe Abb. 6). Der Temperaturquotient $Q_{10^0}$ der Gleichgewichtsverschiebung wird wie folgt berechnet:

$$Q_{10^0} = \frac{H_{40} - H_{30}}{H_{30} - H_{20}}$$

Daraus erhalten wir folgende Temperaturquotienten bei der Patulinkonzentration:

$2{,}5.10^{-3}$ Mol.: $Q_{10^0} = 2{,}9$

und bei $10^{-3}$ Mol.: $Q_{10^0} = 3{,}8$.

Dieses Ergebnis liegt im Rahmen der zu erwartenden biologischen Temperaturquotienten chemischer Reaktionen (HÖBER 1947).

Ganz analog wie auf die $O_2$-Aufnahme wirkt die Temperatur auf die $CO_2$-Abgabe.

## 6. Der Einfluß des pH

Die pH-Abhängigkeit der Atmung hat GEIGER-HUBER (1930) untersucht und dabei festgestellt, daß das pH der Suspensionsflüssigkeit bei Werten zwischen 4,5 und 8,0 auf die Atmungsgeschwindigkeit keinen Einfluß hat. Die Kurve der pH-Abhängigkeit läuft im Bereich des Optimums sehr flach und breit. Unsere Versuche wurden in dem obengenannten Bereich ausgeführt. Das pH kann sich auswirken:

a) auf die Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppen, die in Richtung einer Verminderung der H-Ionen zunimmt (im Modellversuch mit Glutathion oder Cystein [MIESCHER 1950]).

b) auf eine Aktivierung des Patulins, wenn man annimmt, daß die Reaktionsfähigkeit dieses Stoffes mit der Tendenz, den Lactonring zu öffnen, parallel geht. Ist aber dieser Lactonring schon offen, so verhält sich das Patulin inaktiv. Deshalb könnte man sich vorstellen, daß das Patulin nur bis zu einer gewissen Grenze „aktiviert" werden darf.

c) auf die Beschaffenheit der Grenzschicht des Plasmas.

An Hand eines Beispiels (siehe Tabelle 8) wird gezeigt, daß die Patulinhemmung der Atmung mit abnehmender H-Ionenkonzentration zunimmt.

*Tabelle 8*

Der Einfluß des pH auf die $O_2$-Aufnahmehemmung

Temperatur: 30° C; Suspensionsdichte der Hefe: 2 ‰; Patulinkonzentrationen: $10^{-3}$ Mol.; Puffer: Phosphat (nach SÖRENSEN); die pH-Werte wurden mit Glaselektroden elektrometrisch gemessen (BECKMAN-pH-Meter, Modell G)

| pH | Hemmung der $O^2$-Aufnahme in % |
|---|---|
| 4,3 | 55,5 |
| 5,8 | 66,8 |
| 7,1 | 69,6 |

In diesem Kapitel wurde versucht, die chemische Einwirkung des Patulins zu umschreiben. Eine adsorptive Wirkung scheint ausgeschlossen zu sein. Nach dem Adsorptionsgesetz sollte mit steigender Temperatur eine Verminderung der adsorbierten Menge erfolgen. Das Patulin besetzt zuerst rasch die Oberfläche der Protoplasten gemäß Massenwirkungsgesetz, um dann langsam in das Plasma einzudringen. Ob die Einwirkung sich lediglich auf die wesentlichen Proteine der Oberfläche erstreckt oder ob sie zugleich enzymatischer Natur ist, konnte nicht deutlich festgestellt werden. Die Frage nach der Art dieses Eindringens soll im nächsten Kapitel untersucht werden.

## IV. Das Eindringen des Patulins

Wie aus früheren Versuchen ersichtlich ist, könnte die Wirkungsweise dieses Giftes ganz verschieden sein. Deshalb sollen die Verhältnisse in einigen Überlegungen näher analysiert werden.

Der Ort einer chemischen Einwirkung des Patulins auf die Glucosevergärung ist nicht bestimmt, und es bestehen folgende Möglichkeiten:

a) Das Patulin wirkt auf die Vitalität des Plasmas, indem es einen gewissen Prozentsatz des Plasmas einer Zelle abtötet.

b) Das Gift hat eine blockierende Wirkung auf die SH-haltigen Redox-Körper (Miescher 1950), die in enzymatischer Hinsicht als Hilfskatalysatoren wichtig sind und sich an der Oberfläche der Zellen befinden.

c) Die für die Vergärung verantwortlichen Fermente sind an der Oberfläche selbst und werden blockiert oder inaktiviert. Das Patulin könnte also mit dem Substrat in Konkurrenz treten.

d) Das Gift könnte nur langsam durch die semipermeable Oberfläche diffundieren und allmählich in kleinen Konzentrationen in das Innere der Zelle gelangen, um dort seine Wirkung auszuüben. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die in früheren Versuchen erwähnten Tatsachen, daß das Patulin zuerst eine rasche Hemmung bewirkt, die dann langsam zunimmt. Anderseits lassen die Versuche über den Einfluß der Konzentration und der Temperatur eher den Eindruck gewinnen, daß Diffusionsvorgänge durch die Oberfläche keine Rolle spielen. Auch die Tatsache, daß die Semipermeabilität der Plasmagrenzschicht zerstört wird (Gäumann und Mitarbeiter) und die Versuche über das Absterben der Hefezellen sprechen dagegen.

e) Hingegen ist es möglich, daß sich eine Diffusion in die Proteinmasse des Plasmas in rein physikalischer und chemischer Hinsicht unabhängig von der Semipermeabilität (wenn diese zerstört wird) bemerkbar macht. Dies würde der allmählich zunehmenden Drosselung des Gaswechsels in der zweiten Phase nicht widersprechen.

Die Fragen, die in diesem Kapitel besprochen werden, lauten:
Ist eine Konkurrenzhemmung des Patulins mit dem Substrat (Glucose) zu beobachten?
Kann die Atmung irgendwelche Kraft gegen das Eindringen durch die Plasmagrenzschicht aufbringen?
Kann bei Veränderung der Eigenschaften dieser Grenzschicht (Vergrößerung der Porosität) eine Veränderung der Atmungshemmung erzeugt werden?

Als Kriterium wollen wir eine Methodik anwenden, die RUNNSTRÖM und SPERBER (1938) bei ihren Arbeiten über das Eindringen des Fluorids in die Hefezelle ausgearbeitet haben. Sie schreiben: „Aus dem Grade der Hemmung der Veratmung oder Vergärung der Glucose wird das Eindringen des Fluorids beurteilt. Prinzipiell kann diese Methode auch für andere hemmende Stoffe verwendet werden. So haben wir analoge Versuche mit Oxalat, Jodessigsäure, Cystein und Porphyrexid ausgeführt." Sie fanden dabei folgendes: Die Permeabilität der Hefezelle wird bei Verwendung von Fluorid erniedrigt, wenn die Oberfläche mit Glucose besetzt ist. Je nachdem, ob das Gift vor oder nach der Glucose zugegeben wird, ist ein Unterschied in der hemmenden Wirkung zu beobachten. Unterwirft man die Hefe einem Hungerregime, so wird zuerst ihre Glycogenreserve verbraucht; dann erst werden die Proteine angegriffen. Dieser Vorgang soll die Permeabilität erhöhen, weil dabei die Eigenatmung sehr klein wird und Strukturveränderungen an der Oberfläche der Zellen stattfinden. Die Hefe kann daher langdauernd in dest. Wasser suspendiert oder durch Schütteln in einer Sauerstoffatmosphäre (rasche Verbrennung) veraltert (verarmt) werden. Ferner erhöht auch Anaerobie die Permeabilität, weil die Atmungsenergie eine Widerstandsleistung gegen das Eindringen fremder Körper aufbringen kann.

## Hemmung

*Tabelle 9*

Der Einfluß der Oberflächenbesetzung durch die Glucose auf die Hemmung

### 1. Der Einfluß der Glucose auf den Zustand der

Zugabe von Glucose vor oder nach Patulin; Hefesuspensionsdichte: 2 ‰; Patulinkonzentration: $10^{-3}$ Mol.; Glucosekonzentration: 1 %; Temperatur: 30° C; Meßabschnitt: 75 bis 135 Minuten nach Patulinzusatz = 60 Minuten

| Glucosezugabe | Hemmung in % |
|---|---|
| 45 Minuten vor Patulin ..... | 59,8 / 61,4 } 60,6 |
| 60 Minuten nach Patulin ..... | 58,4 / 57,8 } 58,1 |

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, hat es keinen Einfluß, ob das Patulin vor oder nach der Glucose zugegeben wird. Dies bedeutet, daß die Glucose weder durch ihre Oberflächenbesetzung noch durch die starke Atmung, die dem

Eindringen des Giftes entgegenwirken sollte, einen schützenden Einfluß ausüben kann. Die Hemmung erfolgt dementsprechend unabhängig vom Substrat; sie ist also nicht konkurrenzierend, denn laut Definition entsteht eine Konkurrenzhemmung dann, wenn der hemmende Körper auch die für das Substrat spezifischen Fermentgruppen besetzt. Eine nicht konkurrenzierende Hemmung erfolgt, wenn der inaktivierte Körper, unabhängig von der Gegenwart des Substrates, indirekt auf die Fermente wirkt. Na-Fluorid wirkt z. B. konkurrenzierend, indem es die Gruppen des Systems besetzt, die die Phosphorylierung der Glucose bewirken (THOMAS 1946). Gewisse Metalle, die die SH-Gruppen besetzen, wirken nicht konkurrenzierend (LARDY 1950).

Bei der nicht konkurrenzierenden Hemmung besteht kein Zusammenspiel zwischen der Konzentration des Giftes einerseits und der Konzentration des Substrates anderseits. Die folgende Tabelle 10 gibt die Resultate eines Versuchs, der die nicht konkurrenzierende Wirkung des Patulins bestätigt. Dabei wurden verschiedene Glucosekonzentrationen zugesetzt.

*Tabelle 10*

Der Einfluß der Glucosekonzentration auf die Patulinvergiftung

Hefesuspensionsdichte: 2 ‰; Patulinkonzentration: 2,5.10$^{-3}$ Mol.; Temperatur: 30° C; Meßabschnitt: 60 bis 120 Minuten nach Patulinzusatz. Jeder Wert = Mittel aus vier Messungen

| Glucosekonzentration in % | $O_2$-Hemmung in % |
|---|---|
| 10 | 50,5 |
| 1 | 54,2 |
| 0,1 | 60,4 |

Diese Werte sind zu wenig unterschiedlich, um auf eine Konkurrenzhemmung schließen zu lassen. Bei den hohen Glucosekonzentrationen ist es möglich, daß das Plasma infolge Wasserentzugs kompakter wird und dadurch die freie Diffusion des Giftes und die plasmatische Aktivität verlangsamt werden.

## 2. Der Einfluß des Alterns der Hefesuspension

Wie aus der Tabelle 11 zu entnehmen ist, ist auch dieser Faktor ohne jeglichen Einfluß. Die Hefesuspension wurde bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Proben davon wurden nach 0, 1 und 2 Tagen getestet.

*Tabelle 11*

Die Hemmung in bezug auf das Altern der Suspension

Hefesuspensionsdichte: 2 ‰; Patulinkonzentration: 2.10$^{-3}$ Mol.; Temperatur: 30° C; Meßabschnitt: 30 bis 90 Minuten nach Patulinzugabe

| Alter der Suspension in Tagen | $O_2$-Hemmung in % | $CO_2$-Hemmung in % |
|---|---|---|
| 0 | 54 | 48,5 |
| 1 | 50 | 48,5 |
| 2 | 54,8 | 51,7 |

Die Versuche mit künstlich verarmter Hefe, die durch Schütteln während etwa 24 Stunden in einer Sauerstoffatmosphäre erzielt wurde, blieben ebenso erfolglos in bezug auf eine unterschiedliche Hemmung durch Patulin.

### 3. Der Einfluß der Anaerobie auf die Patulinvergiftung

Die für die Anaerobie bestimmten Warburg-Gefäße wurden mit gereinigtem Stickstoff bespült ($O_2$-Absorption mit Pyrogallol, Kontrolle mit Phosphor), und die anderen enthielten Luft. Es wurden bestimmt: $CO_2$ anaerob, $CO_2$ aerob und $O_2$ aerob. Aus zwei Versuchen erhielten wir folgende Hemmungswerte (siehe Tabelle 12):

*Tabelle 12*

Die Hemmung unter aeroben und anaeroben Bedingungen

Hefesuspensionsdichte: 3 ‰; Temperatur 30 ° C

| Patulinkonzentrationen | Hemmung in % | | |
|---|---|---|---|
| | Anaerob $CO_2$ | Aerob $CO_2$ | Aerob $O_2$ |
| $10^{-2}$ Mol. | 96,7 | 94,1 | 96,9 |
| $5.10^{-3}$ Mol. | 68,8 | 72,4 | 86,7 |
| $10^{-3}$ Mol. | 60,0 | 51,6 | 41,2 |

Aus der Tabelle geht hervor, daß auch hier keine wesentliche prozentuale Hemmungsunterschiede zu beobachten sind.

Aus diesem Kapitel kann geschlossen werden:

a) daß das Patulin keine Konkurrenzhemmung mit dem Substrat Glucose aufweist.

b) daß die permeabilitätserhöhende Beeinflussung der Hefe auf die prozentuale Hemmung ohne Effekt ist.

Somit könnte angenommen werden, daß das Patulin nicht in Plasma und Zellraum eindringt und alle Hemmungsvorgänge sich außerhalb der semipermeablen Wand abspielen. Dagegen sprechen jedoch die im nächsten Kapitel behandelten Aufnahmeversuche, die zeigen sollen, daß sehr viel Patulin aufgenommen werden kann, sowie die im letzten Abschnitt erwähnten Versuche über den Einfluß des Giftes auf die endogene Atmung. Auch die Permeabilisierung für Methylenblau ist ein Argument, das dieser Annahme widerspricht.

Da die semipermeabilitätszerstörenden Eigenschaften des Patulins bekannt sind (GÄUMANN und JAAG 1947, GÄUMANN, JAAG und BRAUN 1947, GÄUMANN und VON ARX 1947), ist folgende Hypothese wahrscheinlicher: die Grenzschicht wird sofort aufgelöst, und das Patulin dringt langsam durch Diffusion in das Protein ein, wobei immer wieder die neu aufgedeckten SH-Gruppen besetzt werden. Deshalb sind die Versuche, die die Permeabilität der Grenzschicht erhöhen sollten, in negativem Sinne ausgefallen.

## V. Die Aufnahme des Patulins in Zusammenhang mit der Hemmung

Die Frage der Patulinaufnahme wird hier aufgeworfen, um Zusammenhänge zwischen der eintretenden Hemmung und der Menge Patulin, die diese bewirkt, abzuklären. Es scheint auch interessant, das Aufnahmebild mit demjenigen der Hemmung zu vergleichen, um zu untersuchen, ob die bisherigen Feststellungen mit den hier gefundenen Tatsachen übereinstimmen.

### A. Die Methodik der Patulinbestimmung

Definition: Als Patulinaufnahme messen wir den Patulinschwund aus der Suspensionsflüssigkeit der Hefe.

Prinzip: Die quantitative Bestimmung des Patulins erfolgte auf Grund der Beobachtung, daß es bei Versetzung mit Alkali fluoresziert. Diese Fluoreszenz ist im Bereich von $10^{-3}$ bis $10^{-2}$ Mol. Patulin gut meßbar.

Broom et al. (1944) beschreiben eine kolorimetrische Bestimmungsmethode. Wir haben versucht, die durch Alkali entstehende Gelbfärbung des Patulins mit dem Pulfrichschen Photometer zu messen, erhielten aber eine größere Streuung als mit der fluorimetrischen Methode, die zunächst beschrieben werden soll.

#### 1. Die Apparatur

Ein Lumetron (der Firma Photovolt Corporation New York, Colorimeter Model 402 E) diente zur Fluoreszenz-Messung. Wir benutzten Filter für $B_2$-Bestimmung, da sich diese für Patulin als günstig erwiesen.

#### 2. Die Behandlung des Patulins

Unter der Einwirkung von Alkali verändert sich das Patulin bei Zimmertemperatur relativ langsam. Deshalb wurde die Giftlösung wie folgt behandelt: 1 Teil Patulinlösung wurde mit 1 Teil NaOH 1 n. versetzt, vier Stunden lang im Wasserbad erhitzt und die dabei entstandene Fluoreszenz gemessen. Die folgende Kurve (Abb. 7) ergibt ein Bild der Reaktionsgeschwindigkeit bis zur Erreichung der maximalen Fluoreszenz und zeigt, daß unsere Behandlung genügt, da der Maximalwert nach etwa vier Stunden erreicht wird.

#### 3. Die Eichkurve

Für die Bestimmung der unbekannten Patulinkonzentration wurde eine Eichkurve mit bekannten Konzentrationen hergestellt. Da sich dabei bei Verwendung von dest. Wasser oder „Hefewasser" als Lösungsmittel für Patulin ein Unterschied der Werte bemerkbar machte, wurde stets das letztere

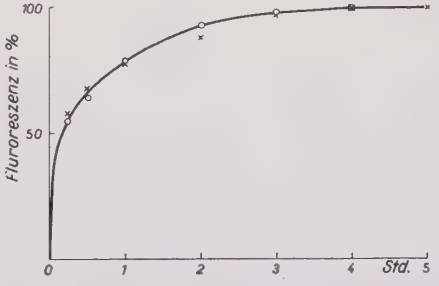



Abb. 7. Das Entstehen der Fluoreszenz einer Patulinlösung als Funktion der Behandlungszeit (siehe Text)
Ordinate: Fluoreszenz in %
Abszisse: Zeit in Stunden.

benutzt. Als „Hefewasser" bezeichnen wir das Suspensionswasser der Hefe, das durch Abzentrifugieren einer Hefesuspension gewonnen wird und das von der Hefe ausgeschiedene, lösliche Stoffe enthält.

Die Fluoreszenz kann im absoluten oder im relativen Maßstab gemessen werden. Beim absoluten Maßstab erhalten wir die absoluten Fluoreszenzwerte. Er wurde verwendet, um die Streuung der Eichwerte festzustellen. Beim relativen Maßstab wird ein beliebiger Standard gewählt und als 100-prozentige Fluoreszenz gewertet. Die anderen Werte sind dann die relativen Prozentwerte dieses Standards. Da die Streuung der einzelnen Eichkurven von Versuch zu Versuch zu groß ist, wurde darauf verzichtet, die Messungen auf eine allgemeingültige mittlere Eichkurve zu beziehen; es wurde für jeden Versuch eine neue Eichkurve hergestellt, und zwar im relativen Maßstab, wobei die Fluoreszenz einer $10^{-2}$ molaren Patulinlösung (1,54 mg/cm³) als 100 Prozent angenommen wurde. Der Arbeitsgang wurde folgendermaßen durchgeführt:

Das Patulin wurde in Hefewasser gelöst und auf die gewünschte Konzentration gebracht. 10 cm³ dieser Lösung wurden in einem Meßkolben von 20 cm³ mit 10 cm³ NaOH 1 n. versetzt, dann vier Stunden lang im Wasserbad erhitzt; nach Abkühlung auf Zimmertemperatur wurde das Volumen wieder ausgeglichen und die Fluoreszenz gemessen. Tabelle 13 ergibt die Werte aus fünf verschiedenen Eichkurven im absoluten Maßstab, sowie Mittelwerte und Streuungen:

*Tabelle 13*

Fluoreszenz der Eichkurven

| Versuchsnummer: | Patulinkonzentrationen a) in Mol.; b) in mg/cm³ | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | a) $10^{-2}$ | $7{,}5.10^{-3}$ | $5.10^{-3}$ | $2{,}5.10^{-3}$ | 0 |
| | b) 1,54 | 0,77 | 0,385 | 0,154 | 0 |
| | Fluoreszenzwerte: | | | | |
| 7 B | 66,0 | 56,5 | 41,5 | 20,0 | 2,0 |
| 9 B | 61,5 | 57,5 | 45,0 | 22,7 | 6,0 |
| 10 B | 68,5 | 59,2 | 43,5 | 19,7 | 2,0 |
| 11 $B_1$ | 68,0 | 61,7 | 43,5 | 20,0 | 3,5 |
| 11 $B_2$ | 67,0 | 61,0 | 45,5 | 21,5 | 3,5 |
| $\overline{M} \pm \sigma$ absolut | $66{,}2 \pm 2{,}8$ | $59{,}1 \pm 2{,}2$ | $44{,}6 \pm 1{,}8$ | $20{,}7 \pm 1{,}3$ | $3{,}4 \pm 2{,}1$ |
| In % | $100 \pm 4{,}2$ | $89{,}4 \pm 3{,}3$ | $67{,}5 \pm 2{,}7$ | $31{,}4 \pm 2{,}0$ | $5{,}1 \pm 3{,}2$ |

Daß die Fluoreszenz der Kontrolle nicht 0 ist, läßt sich durch den Gebrauch von Hefewasser, das eine gewisse Menge von Fluoreszenzstoffen enthält, erklären. Dieser Wert ist jedoch gering. Er wird bei der relativen Messung ausgeschaltet, da der Kontrollwert willkürlich auf 0 gesetzt werden kann. Aus der graphischen Darstellung der Abb. 8 geht hervor:

a) daß sich bei höheren Konzentrationen eine innere Absorption in der Lösung bemerkbar macht, was der Messung eine Grenze setzt.

b) daß sich die Streuung auf die Bestimmung des Patulingehaltes zu stark auswirkt, um zuverlässige Resultate zu erreichen. Sie kann sowohl von der unterschiedlichen Zusammensetzung des „Hefewassers", das bei verschiedenen Hefelieferungen kleine Unterschiede (Phosphatgehalt, Vitamin $B_2$-Gehalt usw.) aufweist, als von physikalischen Ursachen (Temperaturschwankungen im Wasserbad usw.) herrühren.

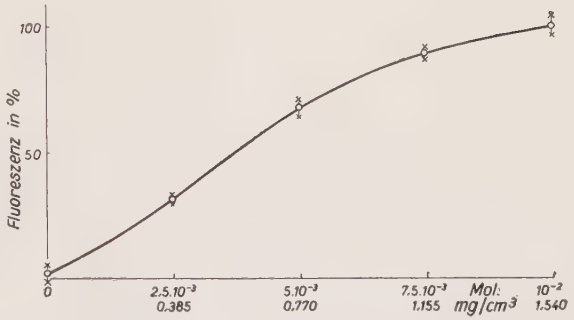



Abb. 8. Die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Patulinkonzentration (Eichkurve)
Ordinate: Fluoreszenz in %
Abszisse: Patulinkonzentration in Mol. oder mg/cm³

Um diese Fehlerquelle zu verkleinern, wurde deshalb für jeden Versuch parallel zur Bestimmung der Patulinaufnahme eine neue Eichkurve hergestellt.

### B. Die Bestimmung der Patulinaufnahme

#### 1. Vorversuche

Es handelte sich darum, das Volumen der Hefezellen in der Suspension zu bestimmen, um eine geeignete, bekannte Ausgangskonzentration des Patulins herstellen zu können und eine günstige Hefesuspensionsdichte herauszufinden, die meßbare Resultate erlaubt.

a) Das Volumen der Hefezellen in der Suspension. — Die Preßhefe enthält immer interzellulares Wasser, das nach Bamann und Myrbäck (1941) etwa 25 % des Hefevolumens beträgt. Nun kann aber dieser Wassergehalt je nach dem Zustand der Preßhefe variieren, und deshalb wurde eine Bestimmungsmethode nach Musfeld (1942) und Rieder (1951) angewandt: Eine Hefesuspension wird hergestellt, dann ihre Zellenzahl nephelometrisch bestimmt (das Nephelometer wurde von Herrn K. Geiger gebaut und eignete sich vollkommen für unsere Zwecke). Das Volumen der Hefezelle wird mit Hilfe von Thomazählkammer und Meßokular gemessen, die beiden erhaltenen Zahlen miteinander multipliziert, und das Resultat ergibt das Hefevolumen in der betreffenden Suspension. Aus 1000 Zellen von fünf verschiedenen Hefesendungen, wobei von jeder Sendung 100 bis 320 Zellen gemessen wurden, ergab sich ein mittleres Volumen von:

$$M_{vol.} = 72{,}4 \pm 4{,}6\ \mu^3$$

Rieder (1951) fand aus zwei Sendungen einen analogen Wert von 77 $\mu^3$. Wir erhalten also:

72,4 $\mu^3$ × Zellenzahl/cm³ Suspension = Hefevolumen/cm³ Suspension.

Um die so erhaltenen Werte zu kontrollieren, wurde das Hefevolumen auch in bezug auf das Gewicht frischer Preßhefe ermittelt, wofür eine kleine Menge Hefe in einem Meßkolben von 20 $cm^3$ abgewogen und dieser mit einer gemessenen Menge Wasser bis zur Marke aufgefüllt wurde. Die Differenz zwischen Kolbeninhalt (20 $cm^3$) und zugegebener Wassermenge ergab das Hefevolumen. Dann wurde das Volumen pro Gramm Frischgewicht berechnet, der Inhalt des Kolbens, d. h. die so erhaltene Suspension, nach der ersten Methode geprüft und der erhaltene Wert auf das Gramm Frischgewicht bezogen. Das Resultat aus vier Messungen ergab:

erste Methode: Vol. der Hefe $\times$ Zellenzahl $= 0{,}900 \pm 0{,}011$ $cm^3/g$;
zweite Methode: Vol. des verdrängten Wassers $= 0{,}911 \pm 0{,}055$ $cm^3/g$.

Wie schon erwähnt, mag die Differenz ihren Ursprung im interzellularen Wasser der Hefe haben, beträgt aber nur etwa 1 %. Es ist anzunehmen, daß die Hefe in freier Suspension infolge des osmotischen Ausgleiches an Volumen zunimmt. Die erste Methode ergibt den wesentlichen Vorteil, daß dabei der Wassergehalt der Preßhefe nicht ins Gewicht fällt und daß die Streuung fünfmal kleiner ist als bei der zweiten Messungsart.

b) Die Suspensionsdichte der Hefe. — Die besten Ergebnisse werden erzielt, wenn mit einer zehnprozentigen Suspension gearbeitet wird. Da nur relativ wenig Patulin aufgenommen wird, erweisen sich kleinere Suspensionsdichten als zu gering, um außerhalb der Fehlergrenze zu bleiben.

## 2. Der Versuchsgang

Er war folgender: Eine 20prozentige Hefesuspension wurde vorbereitet (die gewaschene Hefe wurde über Nacht bei Zimmertemperatur geschüttelt) und das Volumen der Hefe V am Versuchstag bestimmt. Eine abgemessene Menge der Suspension wurde in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Der Wassergehalt der Suspension betrug:

$$W = A - V \text{ cm}^3$$

wobei A = abgemessene Menge der Suspension,
V = Volumen der Hefe in der Suspension.

Nun wurde in der Zeit $t = 0$ dieser Suspension W $cm^3$ einer Patulinlösung der Konzentration 2 K zugegeben. Die Hefesuspensionsdichte betrug jetzt etwa 10 % und die Patulinkonzentration die gewünschte Ausgangskonzentration K. Ab Zeit $t = 0$ wurde die Suspension bei der Versuchstemperatur (meist 30 ° C) geschüttelt; dann wurden ihr in gewissen Zeitabständen Proben von 15 $cm^3$ entnommen; diese wurden abzentrifugiert, 10 $cm^3$ davon mit 10 $cm^3$ NaOH 1 n. versetzt, vier Stunden lang im Wasserbad behandelt und auf ihre Fluoreszenz geprüft. Die erhaltenen Werte wurden mit den Eichwerten verglichen und daraus die Konzentrationsdifferenzen, d. h. die verschwundene Menge Patulin bestimmt.

Zur parallelen Prüfung der Atmungshemmung wurde die vergiftete Hefe dreimal durch Zentrifugieren gewaschen und in der gewünschten Menge dest.

Wasser aufgeschlämmt. Die hier erwähnten Versuche wurden alle bei Versuchstemperaturen von 20 und 30 ° C ausgeführt. Die Schüttelfrequenz betrug 100 bis 120 Schwingungen pro Minute.

### 3. Besprechung der Versuche

Folgende Fragen sollen besprochen werden:

a) Wie verläuft das Aufnahmebild in der Zeit? Sind dabei zwei Phasen zu unterscheiden? Welchen Einfluß hat die Patulinkonzentration?

b) Wie wirkt sich die Patulinaufnahme auf die Glucose-Atmungshemmung aus? Welches sind die quantitativen Beziehungen zwischen aufgenommener Patulinmenge und Hemmung?

c) Welche quantitativen Beziehungen bestehen zwischen der aufgenommenen Patulinmenge und dem Hefefrisch- und -trockengewicht?

d) Welche Fehlermöglichkeiten bestehen bei der Messung der Patulinaufnahme?

#### Ergebnisse

Die Kurve der Abb. 9a ergibt das Aufnahmebild des Patulins bei Ausgangskonzentrationen von $10^{-2}$ Mol., $5.10^{-3}$ Mol. und $2{,}5.10^{-3}$ Mol. Patulin und 20 ° C während sechs Stunden. Die in $^1/_{100}$ mg aufgenommene Menge bezieht sich auf eine Milliarde ($10^9$) Hefezellen. Wie aus der graphischen Dar-

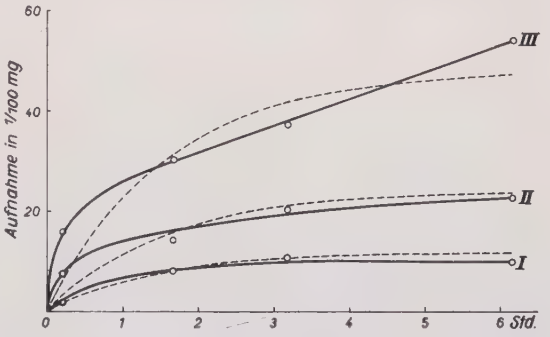



Abb. 9 a. Die Patulinaufnahme von Hefe bei 20 ° C
Ordinate: Aufnahme in $^1/_{100}$ mg Patulin pro $10^9$ Zellen
Abszisse: Aufnahmezeit in Stunden

Kurve I: Patulin $2{,}5.10^{-3}$ Mol.
Kurve II: Patulin $5.10^{-3}$ Mol.
Kurve III: Patulin $10^{-2}$ Mol.

——— praktische Kurven
- - - - - - theoretische Kurven

stellung ersichtlich ist, geht die Aufnahme in den ersten Minuten sehr rasch vor sich, um dann abzuklingen (1. Phase). Nach etwa drei Stunden ist das „Gleichgewichtsstadium" der langsamen und regelmäßigen Aufnahme erreicht (2. Phase). Eine Konzentrationsabhängigkeit ist auch hier, wie bei der Atmung, wahrzunehmen. Daß bei der Konzentration $2{,}5.10^{-3}$ Mol. Patulin die Kurve sogar abnimmt, ist wahrscheinlich einem methodischen Fehler zuzuschreiben. Daß sich das „Gleichgewicht" erst nach drei Stunden einstellt, ist auf die Versuchstemperatur von 20 ° C zurückzuführen, bei welcher die Reaktionsfähigkeit des Patulins relativ klein ist (siehe Temperaturabhängigkeit der Atmungshemmung). Bei 30 ° C stellt es sich rascher ein.

Es wurde nun untersucht, ob diese Verhältnisse mit den Diffusionsgesetzen zu erklären sind. Da die Suspensionen geschüttelt wurden, darf angenommen werden, daß in der Außenlösung die Konzentration ($C_1$) einheitlich ist. Im Innern der Zelle nehmen wir der Einfachheit halber auch eine einheitliche Konzentration ($C_2$) an. Die in der Zeiteinheit dt aufgenommene Patulinmenge dP ist dann:

(1) $$dP = q(C_1 - C_2)dt$$ (vgl. HÖBER 1947, Kap. 1)

wobei: q = Proportionalitätsfaktor.

Ferner können wir sagen:

(2) $$C_1 = C_0 - \frac{P}{V}$$

wobei: $C_0$ = Anfangskonzentration des Patulins,
V = Volumen der Außenlösung.

Die Patulinkonzentration im Innern wird, wie bereits festgestellt, durch eine chemische Reaktion, die dem Massenwirkungsgesetz gehorcht, vermindert:

(3) $$\frac{[A\,B]}{[A]\,[B]} = K$$ (vgl. Seite 234)

Die Summe der beiden Konzentrationen [AB] + [A] muß nun gleich $\frac{P}{v}$ sein, wobei v das Volumen der Hefezellen bedeutet. [A] entspricht unserem $C_2$ in Gleichung (1). Wir erhalten daher aus Gleichung (3):

(4) $$\frac{[A\,B]}{[A]\,[B]} = \frac{\frac{P}{v} - C_2}{C_2\ [B]} = K$$

$$C_2\,[B]\,K = \frac{P}{v} - C_2$$

(4 a) $$C_2 = \frac{P}{v\,([B]\,K + 1)}$$

d. h. die Konzentration im Innern ist der eingedrungenen Patulinmenge P proportional. Wir können nun statt Gleichung (1) schreiben:

(5) $$dP = q\left(C_0 - \frac{P}{V} - \frac{P}{v\,(B\,[K] + 1)}\right) dt = (qC_0 - LP)dt$$

(L ist ein Proportionalitätsfaktor).

Durch Integration erhält man:

(6) $$P = \int_0^T (qC_0 - LP)dt = \frac{qC_0}{L}\,(1 - e^{-LT})$$

(6 a) $$-LT = \ln\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right) = \frac{\log\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right)}{\log e}$$

wobei T = Aufnahmedauer.

Die in unendlich langer Versuchsdauer aufgenommene Menge Patulin wäre nach Gleichung (6) gleich $\frac{qC_0}{L}$; diese Größe läßt sich graphisch bestimmen. Zum Beispiel kann man die in die Zelle eingedrungene Patulinmenge (P) durch die Anfangskonzentration $C_0$ dividieren, um die drei Kurven von Abb. 9 a (Aufnahme bei 20° C) auf eine zu reduzieren. Durch die erhaltenen Punkte läßt sich von Hand eine mittlere Kurve zeichnen, aus der sich $\frac{qC_0}{L}$ abschätzen läßt. Der geschätzte Wert kann nun in Gleichung (6 a) eingesetzt werden, was erlaubt, $\log\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right)$ zu berechnen. Dieser log muß proportional zur Aufnahmedauer T sein. Abb. 9 b zeigt, daß dies ganz ordentlich stimmt (siehe auch Abb. 9 a, theoretische Kurven nach Formel [6 a]), in Vergleich zu den praktischen Kurven). (Es ist zu bemerken, daß bei der $10^{-2}$ molaren Patulinlösung sich wahrscheinlich noch ein anderer Effekt überlagert, den wir hier nicht näher untersuchten.) Aus der Gleichung der Geraden in Abb. 9 b läßt sich auch L berechnen, was uns weiterhin gestattet, den Anteil des in der chemischen Reaktion gebundenen Patulins $\frac{1 - C_2v}{P}$ oder $\frac{[AB]v}{P}$ zu berechnen. Wir erhalten für diesen Anteil etwa 86%. Vom eingedrungenen Patulin ist also bloß etwa 14% in freier Form, die hinausdiffundieren kann, vorhanden. Dies erklärt auch die Tatsache, daß das Verhältnis $\frac{P}{v}$ ein Vielfaches der Patulinkonzentration in der Außenlösung erreicht.

Dieselbe Berechnung läßt sich auch für die Aufnahme bei 30° C (Abb. 10 a) durchführen. Sie ergibt zwar eine annähernd lineare Abhängigkeit zwischen T und $\log\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right)$, doch geht die Gerade nicht durch den Ursprung des Koordinatensystems (Abb. 10 b). Dies läßt sich vielleicht durch

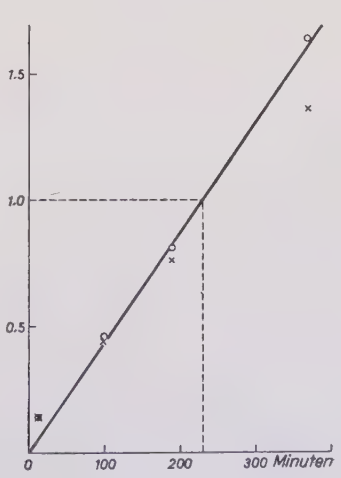



Abb. 9 b. Erklärung siehe Text (Aus Versuch 9 a. Temperatur 20° C)

Ordinate: $-\log\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right)$

Abszisse: Aufnahmedauer in Minuten

o Punkte für $\frac{q}{L} = 4{,}8 \cdot {}^1/_{100}$ mg/cm³ für eine $10^{-3}$ molare Lösung berechnet

x Punkte für $\frac{q}{L} = 4{,}7 \cdot {}^1/_{100}$ mg/cm³ für eine $10^{-3}$ molare Lösung berechnet

— log = 1 für 230 Minuten

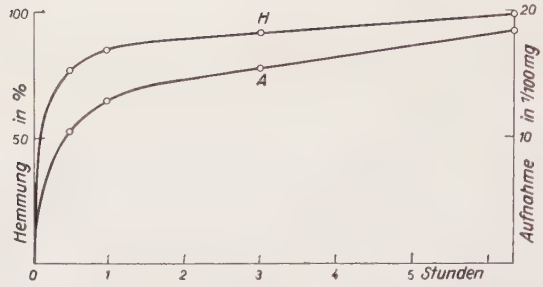



Abb. 10 a. Relation zwischen der Patulinaufnahme und der Hemmung der $O_2$-Aufnahme. Patulinkonzentration: $5.10^{-3}$ Mol.

Ordinate links: Hemmung der $O_2$-Aufnahme in % = Kurve H

Ordinate rechts: Patulinaufnahme in $^1/_{100}$ mg pro $10^9$ Zellen = Kurve A

Abszisse: Zeit in Stunden

eine Adsorption in der 1. Phase der Patulinaufnahme oder durch eine irreversible chemische Reaktion an der Zelloberfläche erklären. Schon in Abb. 9 b läßt sich etwas Ähnliches vermuten, doch sind dort die Abweichungen vom reinen Diffusionsgesetz zu gering, um sicher festgestellt zu werden. (Für die rechnerischen Arbeiten möchte ich Herrn Dr. H. HUBER, Basel, für seine Mithilfe meinen freundlichsten Dank aussprechen.)

Die nächsten zwei Kurven ergeben die Antwort auf die Beziehung zwischen Atmungshemmnug und Aufnahme.

Bei Abb. 10 a beträgt die Patulinkonzentration $5.10^{-3}$ Mol., die Temperatur 30 ° C, die Meßdauer sechs Stunden. Jeder Punkt der Aufnahmekurve wurde zweimal mittels Parallelreihen bestimmt; die $O_2$-Aufnahmemessung bzw. Hemmungswerte stammen aus je sechs Einzelmessungen. Bei beiden Kurven tritt das Gleichgewichtsstadium nach einer Stunde ein. Dann tendiert die Hemmung der $CO_2$-Aufnahme allmählich gegen 100 %, während die Patulinaufnahme sich beinahe linear fortsetzt und nur um einen minimalen Betrag sinkt. Daß die Patulinaufnahme in einer längeren Zeitspanne abklingen muß, ist verständlich; denn die Nachschubskonzentration sinkt, was bei der 2- bis 8 %oigen Hefesuspensionsdichte praktisch nicht der Fall war. Zwei Tatsachen sollen noch hervorgehoben werden:

a) Bevor die Hefe zum Warburg-Versuch gelangte, wurde sie dreimal gewaschen, was die Hemmung der $O_2$-Aufnahme nicht rückgängig machen konnte: das Patulin sitzt fest, die Schädigung ist irreversibel. Auf Grund technischer Schwierigkeiten (geringe Empfindlichkeit der Fluoreszenzmessung des Patulins, die kaum zuverlässige Werte unterhalb einer Konzentrationsgrenze von $10^{-3}$ Mol erfassen läßt) wurde eine eingehendere Prüfung der Auswaschbarkeit nicht vorgenommen.

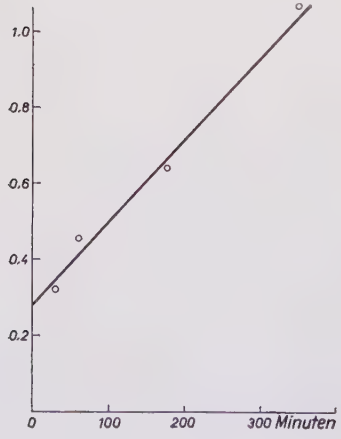



Abb. 10 b. Erklärung siehe Text (Aus Versuch 10 a. Temperatur 30 ° C)

Ordinate: $-\log\left(1 - \frac{PL}{qC_0}\right)$

Abszisse: Aufnahmezeit in Minuten

b) Eine große Hemmung der Atmung ist schon bei geringen Patulinmengen eingetreten. Eine Menge von etwa $^{5}/_{100}$ mg Patulin pro $10^9$ Zellen bewirkt schon eine 50prozentige, $^{13}/_{100}$ mg eine 85prozentige und $^{18}/_{100}$ mg eine 97,7prozentige Hemmung. Daraus geht hervor, daß die 50prozentige Hemmung sehr rasch entsteht und daß rund dreimal weniger Patulin, als für die 97,7prozentige Hemmung erforderlich ist. Diese Tatsache könnte so interpretiert werden, daß in der ersten Phase des Kurvenverlaufes das Patulin rasch wichtige Stoffe, die direkt oder indirekt die Atmung und Gärung beeinflussen, inaktiviert, um sich dann weiter durch langsames Eindringen mit Stoffen zu verbinden, die schwerer erreichbar sind und die zum Teil nicht unbedingt mit dem Gasstoffwechsel in Zusammenhang stehen.

Der nächste Versuch befaßt sich mit dem Problem der quantitativen Patulinaufnahme in Verbindung mit der Atmungshemmung (Abb. 11). Die Darstellung zeigt den Verlauf der Hemmung der $O_2$- und Patulinaufnahme für Patulinausgangskonzentrationen von $10^{-2}$, $5.10^{-3}$, $2{,}5.10^{-3}$ und $10^{-3}$ Mol. bei 30° C. Die Kurven verlaufen denjenigen des vorherigen Beispiels analog. Bei der Konzentration $10^{-2}$ Mol. sind nach sechs Stunden $^{105}/_{100}$ mg

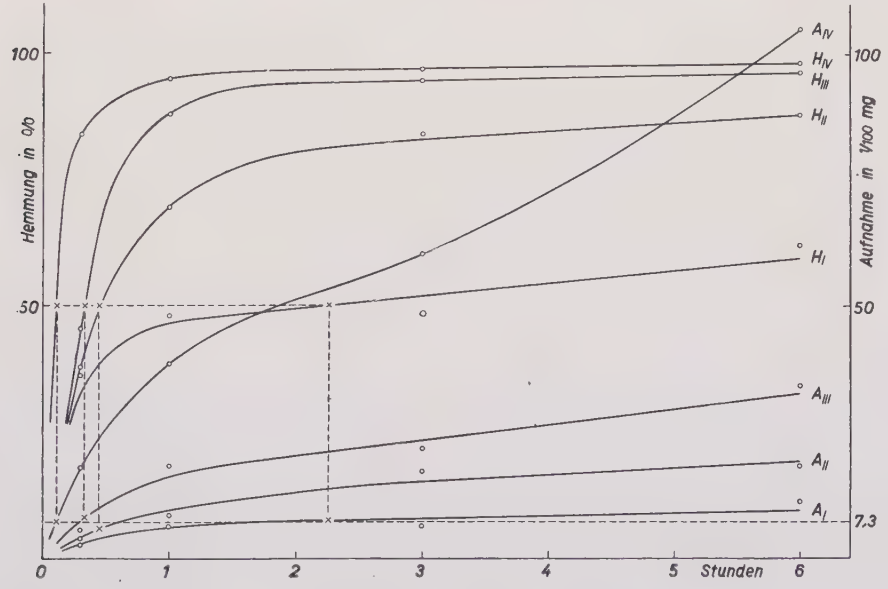



Abb. 11. Die Abhängigkeit zwischen Patulinaufnahme, Patulinkonzentration und Hemmung der $O_2$-Aufnahme

Ordinate links: Hemmung der $O_2$-Aufnahme in % = Kurven $H_I$ — $H_{IV}$
Ordinate rechts: Patulinaufnahme in $^{1}/_{100}$ mg pro $10^9$ Zellen = Kurven $A_I$ — $A_{IV}$
Patulinkonzentrationen in Mol.: I = $10^{-3}$; II = $2{,}5.10^{-3}$; III = $5.10^{-3}$; IV = $10^{-2}$
---×---- = 50prozentige $O_2$-Aufnahmehemmung und entsprechende Patulinaufnahme (im Mittel 0,073 mg pro $10^9$ Zellen) für die verschiedenen Konzentrationen

pro $10^9$ Zellen, d. h. $^3/_5$ der total zur Verfügung stehenden Ausgangsmenge aufgenommen worden. Bei $5.10^{-3}$ Mol. sind es $^{34}/_{100}$ mg oder $^2/_5$, bei $2{,}5.10^{-3}$ Mol. $^{18}/_{100}$ mg oder $^2/_5$ und bei $10^{-3}$ Mol. $^{11}/_{100}$ mg oder $^3/_5$. Die aus der Kurve berechnete 50prozentige Hemmung wird bei allen Konzentrationen von der gleichen Menge Patulin verursacht, wie die nächste Tabelle zeigt:

*Tabelle 14*

Die für die 50prozentige Atmungshemmung notwendige Patulinmenge

| Ausgangspatulinkonzentration in Mol. | Patulinmenge $^1/_{100}$ mg pro $10^9$ Zellen, die die 50%ige Hemmung verursacht |
|---|---|
| $10^{-2}$ | 7,5 |
| $5.10^{-3}$ | 8,2 |
| $2{,}5.10^{-3}$ | 6,0 |
| $10^{-3}$ | 7,5 |
| Mittelwert $\pm \sigma m =$ ..... | $7{,}3 \pm 0{,}25$ |

Vergleichen wir diese Tatsache mit derjenigen der Dosis minima beim Welkeeffekt, wo festgestellt wurde, daß mit sinkender Konzentration einem Tomatensproß mehr Gift zugegeben werden mußte, um die gleiche Schädigung hervorzurufen (MIESCHER 1950), so dürfen wohl die wesentlich komplizierteren und unübersichtlicheren Verhältnisse, die bei einer ganzen Pflanze auftreten, die Ursache dieses Effektes sein. Werden einer Pflanze gleiche Mengen Patulin in verschiedenen Konzentrationen verabreicht, so ist bei höheren Konzentrationen eine größere Schädigung der Leitbündelzellen und als Folge dessen eine tiefgreifende Störung des Saftsteigens in die anderen Gewebe zu erwarten, was bei schwächeren Konzentrationen nicht der Fall ist, so daß das Patulin in diesem Falle im ganzen Organismus besser verteilt wird. Diese Tatsachen und die hier gefundenen sind deshalb nicht als sich widersprechend zu betrachten.

### 4. Quantitative Beziehungen zwischen Patulinaufnahme, Frisch- und Trockengewicht der Hefezellen

Aus 10 Bestimmungen der Zellenzahl pro Gramm frisch bezogener Preßhefe (Frischgewicht) erhielten wir folgende Werte: 1 g Frischgewicht = 11,66 ± 0,61 Milliarden Zellen. Aus fünf Bestimmungen des Trockengewichtes in bezug auf das Frischgewicht ergab sich: 1 g Frischgewicht entspricht 0,286 ± 0,021 g Trockengewicht, d. h.,28,6% Trockengewicht in bezug auf das Frischgewicht. RUNNSTRÖM und SPERBER (1938) erhielten das gleiche Ergebnis (28 %). Nun ist die Patulinmenge, die die 50prozentige $O_2$-Aufnahmehemmung bewirkt, gleich $^{7,3}/_{100}$ mg pro $10^9$ Zellen (Abb. 11 zitiertes Beispiel), was für 1 g Frischgewicht einer Menge von 0,851 mg (oder 8 5 1 mg pro kg Frischgewicht) und für 1 g Trockengewicht einer Menge

von 2,98 mg (oder 2980 mg pro kg Trockengewicht) entspricht.

### 5. Die Fehlerquellen bei der Messung der Patulinaufnahme

Folgende Fehlerquellen könnten eine Rolle spielen:

a) Verdunstungsverlust. — Durch Verdunstungsverlust der Hefesuspension kann eine Konzentrationserhöhung des Patulins erfolgen. Eine Prüfung dieser Frage ergab bei Patulinlösungen von $10^{-2}$, $5.10^{-3}$ und $2{,}5.10^{-3}$ Mol., die bei 30° C während sechs Stunden geschüttelt wurden, ein negatives Resultat. Die Kolben waren mit einem dichten Wattebausch verschlossen und enthielten am Anfang 60 $cm^3$ Lösung, wovon vier Proben von je 10 bis 12 $cm^3$ in der ersten, zweiten, vierten und sechsten Stunde entnommen und geprüft wurden.

b) Austritt von Vitamin $B_2$. — Da die Messungen mit einem Vitamin-$B_2$-Filtersatz ausgeführt wurden, ist es möglich, daß sich ein Austritt dieses Stoffes bemerkbar machen kann, indem sich die Fluoreszenz zusätzlich zur reinen Patulinfluoreszenz addiert. Dies hat zur Folge, daß die Patulinaufnahmewerte zu klein ausfallen können, und vor allem diejenigen der Proben, die nach längerer Zeit gemacht wurden. Dabei könnte eine Erklärung für das Sinken der Aufnahmekurve bei niederen Patulinkonzentrationen ($2{,}5.10^{-3}$ und $10^{-3}$ Mol.) zu finden sein. Deshalb wurde eine Hefesuspension ohne Patulinzusatz während zwölf Stunden bei 30° C geschüttelt. Das „Hefewasser" wurde dann wie die Patulinlösung mit Alkali und Wasserbad behandelt. Dabei wurden folgende relative Fehlerfluoreszenzen erhalten:

nach 2 Stunden: 9,1 %
nach 6 Stunden: 9,8 %
nach 12 Stunden: 9,8 %

} wenn dest. Wasser = 0 % und $10^{-2}$ Mol. Patulin in dest. Wasser = 100 %.

Dazu ist zu bemerken, daß, wenn die Eichkurve, ähnlich wie in den Versuchsreihen, selbst mit Hefewasser angefertigt wird, diesen Werten ein Abzug von 5,1 % (Kontrollwert ohne Patulin) gemacht werden darf, so daß die Fehlermöglichkeit rund 4 % ausmachen kann, was sich natürlich nur in den kleinen Patulinwerten merklich ausdrücken kann.

c) Austritt von schwach gebundenen, fluoreszierenden Patulinkomplexen. — Eine weitere, nicht geprüfte Fehlermöglichkeit liegt in dem Austritt von fluoreszierenden Stoffen oder locker gewordenen Patulinverbindungen, welcher durch die vom Patulin verursachte Schädigung der Zelle (Permeabilität u. a.) hervorgerufen worden ist. Die Schwierigkeit einer solchen Prüfung hat uns davon abgehalten, sie eingehender zu erfassen.

## VI. Einfluß der Patulinvergiftung auf die Eigenatmung

Die Eigenatmung oder endogene Atmung ist der innere Reserveverbrauch der Hefezelle, die keinen Zucker enthält. Es ist eine reine Atmung, ohne Gärung. Als Substrat können das gespeicherte Glycogen oder andere Reservekohlenhydrate, sowie Proteine und Fette verbraucht werden. Es handelt sich also um ein Hungerregime. Wie gestaltet sich die Einwirkung des Patulins auf diesen Vorgang, der von demjenigen der Glucosevergärung verschieden verläuft?

### 1. Methodisches

Die günstige Hefesuspensionsdichte für diese Untersuchung war eine zweiprozentige. Sonst war die Arbeitsweise der Glucoseveratmungsmessung analog.

### 2. Das allgemeine Atmungsbild bei Patulinvergiftung

Abb. 12 stellt den Verlauf der Eigenatmung dar, wobei folgende Versuchsbedingungen gegeben waren:

Temperatur: 30 ° C; Patulinkonzentrationen in Mol.: $5.10^{-3}$, $10^{-2}$, $2{,}5.10^{-2}$; Patulinzusatz nach einer Stunde; Versuchsdauer: zwölf Stunden; jede Kurve wird aus zwei Punktserien ermittelt; Darstellung von $O_2$- und $CO_2$-Werten.

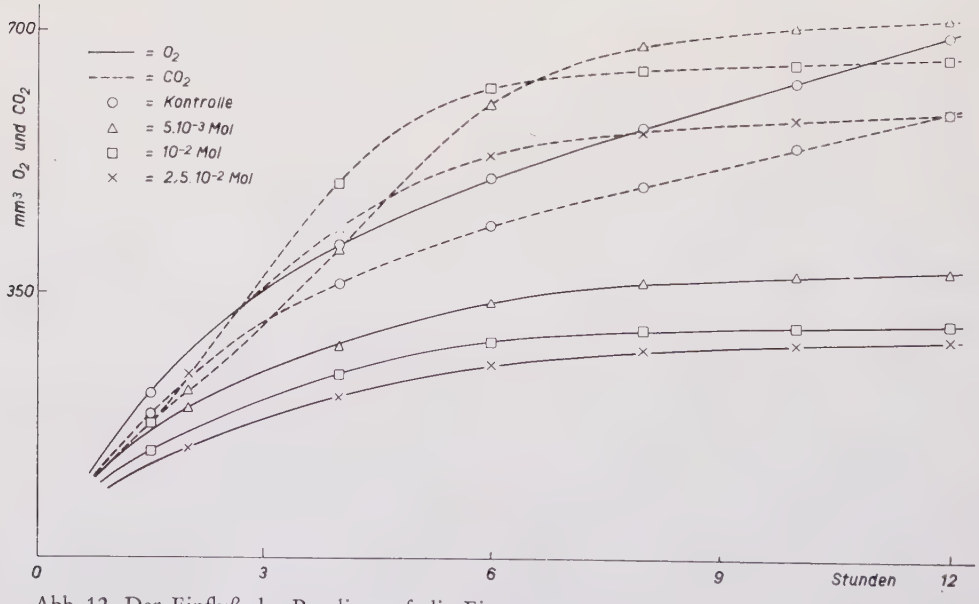



Abb. 12. Der Einfluß des Patulins auf die Eigenatmung
Ordinate: $O_2$-Aufnahme bzw. $CO_2$-Abgabe in $mm^3$
Abszisse: Zeit in Stunden
Die verschiedenen Punktzeichen entsprechen den verschiedenen Patulinkonzentrationen

Analysieren wir den Verlauf der dargestellten Kurven, so stellen wir fest:

a) daß die Kontrollkurven in der zwölfstündigen Versuchszeit zuerst schwach abnehmen, was auf die langsame Anpassung der Hefe an die Versuchsbedingungen zurückzuführen ist, dann aber eine regelmäßige Steigung aufweisen, d. h., die normale Eigenatmung geht in einem Gleichgewichtsstadium vor sich. Dabei ist der Atmungsquotient stets kleiner als 1, die Hefe braucht mehr Sauerstoff, als sie $CO_2$ abgibt. Das ist für eine Atmung im Hungerstadium bezeichnend. Warburg (1926) schreibt: „Verbrennt dagegen Eiweiß oder Fett, so erscheint auf ein Molekül verschwundenen Sauerstoffs nicht ein Molekül Kohlensäure, sondern weniger."

b) daß bei den Kurven mit Patulinkonzentrationen von $5.10^{-3}$ Mol., $10^{-2}$ Mol. und $2{,}5.10^{-2}$ Mol. eine Inversion des Atmungsquotienten eintritt; er wird größer als 1. Die $O_2$-Aufnahme wird mit steigender Giftkonzentration gehemmt, und die $CO_2$-Abgabe erfährt eine sehr starke Steigerung. Wie das zitierte Beispiel zeigt, setzt sich dieser Zustand während einiger Stunden fort, bis dann zwischen der fünften und siebenten Stunde je nach Patulinkonzentration eine ziemlich rasche Abnahme der $CO_2$-Abgabe und der $O_2$-Aufnahme erfolgt. Nach der zehnten Stunde ist die Eigenatmung praktisch total gehemmt.

c) daß die optimale Geschwindigkeitssteigerung der $CO_2$-Abgabe nicht über diejenige der $10^{-2}$ Mol. Kurve geht, aber der Gesamtbetrag der aufgenommenen $O_2$- wie der abgegebenen $CO_2$-Menge am Schluß des Versuches mit der Giftkonzentration in Verbindung steht, d. h. daß die Beträge mit steigender Patulinkonzentration kleiner sind.

Wir haben also hier eine verschiedene Einwirkung des Giftes auf die $O_2$-Aufnahme und die $CO_2$-Abgabe. Da die Kontrolle einen reinen Atmungsvorgang darstellt, ist es wahrscheinlich, daß das Gift das Eintreten einer Gärung (starke $CO_2$-Abgabe) verursacht, d. h. Stoffe, die sonst veratmet werden, vollständig vergoren werden. Eine eingehende Prüfung dieser Erscheinung unter anaeroben Bedingungen war unmöglich; denn anaerob findet weder Eigenatmung noch Eigengärung statt. Runnström und Sperber (1938) bemerken: „Unter aeroben Verhältnissen herrscht während der Vorperiode eine Eigenatmung. Dagegen findet man bei der Bäckerhefe (anaerob), wie schon Stier und Stannard hervorgehoben haben, keine Eigenatmung."

Für die Darstellung der nächsten Resultate werden immer Werte verglichen, bei denen unter der Einwirkung des Giftes die maximale $CO_2$-Abgabeintensität eingetreten ist. Beim zitierten Beispiel wäre dies im Abschnitt zwischen der zweiten und vierten Stunde nach Patulinzusatz der Fall.

### 3. Der Einfluß der Patulinkonzentration auf die Eigenatmung und auf den Atmungsquotienten

Zwei Beispiele sollen den Einfluß der Konzentration auf die Gaswechselintensität und den Atmungsquotienten illustrieren und zeigen, daß unter dem

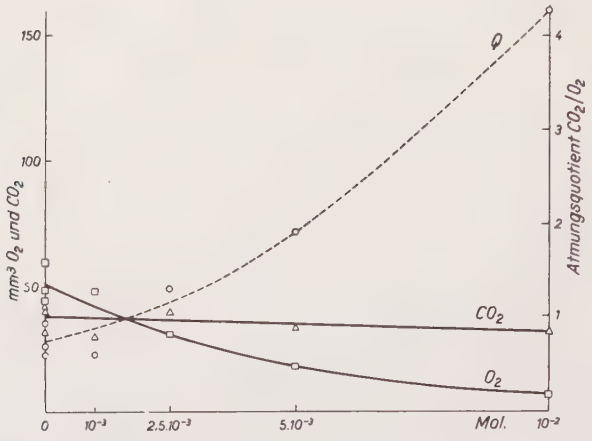



Abb. 13. Der Einfluß der Patulinkonzentration auf die Eigenatmung und auf den Atmungsquotienten

Ordinate links: $O_2$-Aufnahme bzw. $CO_2$-Abgabe in $mm^3$

Ordinate rechts: Atmungsquotient $Q = CO_2/O_2$. Die Einheit $Q = 1$ ist durch die Höhe des Schnittpunktes der $O_2$- und $CO_2$-Kurve gegeben

Abszisse: Patulinkonzentration in Mol.

gungen: Patulinkonzentrationen in Mol.: $10^{-3}$, $2{,}5.10^{-3}$, $5.10^{-3}$ und $10^{-2}$; Meßintervall: 90 bis 210 Minuten nach Patulinzusatz; Temperatur: 30° C; Suspensionsdichte: 2 %.

Wie aus den beiden Beispielen ersichtlich ist, ist in beiden Fällen der Atmungsquotient mit der Patulinkonzentration stark gestiegen, und zwar unabhängig von der absoluten Gaswechselintensität der beiden Komponenten. Bei der frischen Suspension, die an verbrennbaren Substanzen reichhaltiger ist, ist die $O_2$-Aufnahme nur schwach gehemmt, die $CO_2$-Abgabe stark gesteigert. Bei der alten Suspension dagegen sind die Verhältnisse umgekehrt: die $O_2$-Aufnahme ist stark, die $CO_2$-Abgabe nur schwach gehemmt. Die Patulinwirkung auf die Eigenatmung ist also:

a) konzentrationsabhängig; mit steigender Konzentration steigt auch die Wirkung, d. h. die Intensitäten der $O_2$-Aufnahme und $CO_2$-Abgabe werden stärker getrennt.

Einfluß der Vergiftung zwischen dem Zustand der Hefe (Alter der Suspension) und dem Gaswechsel eine Abhängigkeit besteht.

Abb. 13 zeigt die Konzentrationsabhängigkeit des Gaswechsels einer eintägigen Hefesuspension bei folgenden Versuchsbedingungen: Patulinkonzentrationen in Mol.: $10^{-3}$, $5.10^{-3}$ und $10^{-2}$; Meßintervall: 120 bis 240 Minuten nach Patulinzusatz; Temperatur 30° C; Suspensionsdichte: 2 %.

Abb. 14 zeigt das Beispiel einer viertägigen Suspension. Versuchsbedin-

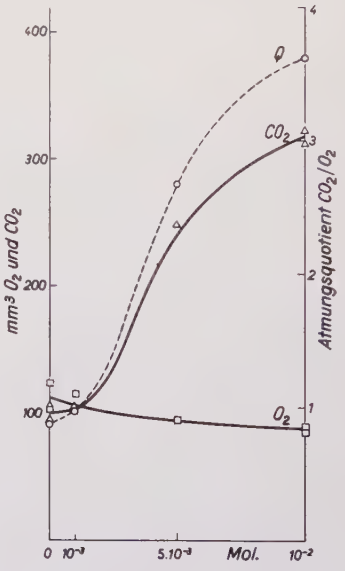



Abb. 14. Der Einfluß der Patulinkonzentration auf die Eigenatmung und auf den Atmungsquotienten

Eintägige Hefesuspension.

Ordinate und Abszisse wie in Abb. 13

b) abhängig von dem Alter der Hefesuspension in bezug auf die absoluten $O_2$- resp. $CO_2$-Werte.

### 4. Über die Möglichkeit eines Abbaus des Patulins

Aus den oben erwähnten Beobachtungen wurde vermutet, daß die Hefe imstande ist, Patulin abzubauen. Ein solcher Abbau würde als Abwehrreaktion die vorliegende Arbeit mit einem fundamentalen Problem der Pflanzenpathologie verknüpfen. In einer Kultur von *Penicillium urticae* verschwindet z. B. die Aktivität des Kulturfiltrates (durch das Patulin verursacht) wieder nach einem Maximum, und zwar bei 27° C nach sieben Tagen. In diesem Falle muß das Patulin vom Organismus, der das Filtrat bildet, wieder aufgenommen werden. Wie das geschieht, ist nicht bekannt.

Miescher (1950) spricht jedoch gegen einen Abbau des Patulins durch die vergiftete Pflanze: „Ein enzymatischer Abbau des Patulins scheint daher — meßbar innerhalb 30 Stunden — nicht stattzufinden." Diese Ansicht ist in unserem Falle durch zwei Tatsachen unterstützt:

a) Wird die Hefe vergiftet, abzentrifugiert und gewaschen, so hält die gesteigerte $CO_2$-Abgabe an, und der Wert des Atmungsquotienten bleibt über 1, auch wenn kein Patulinnachschub mehr stattfindet.

b) Wird der Hefe einige Zeit nach der Patulinzugabe ein zweiter Zusatz verabreicht, so bleibt dieser auf den Kurvenverlauf und auf die totale $CO_2$-Abgabe resp. $O_2$-Aufnahme ohne Einfluß.

Der nächste Abschnitt spricht auch dagegen, indem er zeigt, daß bei gegebener Patulinkonzentration eine starke Abhängigkeit von der Kohlehydrat-Substratmenge existiert. Der Atmungsquotient steigt, trotzdem die Patulinmenge konstant geblieben ist.

### 5. Der Einfluß des Glycogengehaltes der Hefe

Wie bereits erwähnt, spielt das Alter der Hefesuspension bei der Gaswechselintensität eine Rolle, sei es nun bei der vergifteten oder unvergifteten Hefe. Die Vergiftung bringt jedoch die Erscheinung klar zum Vorschein. Nun untersuchten wir den Einfluß des Glycogengehaltes auf die Eigenatmung und erhielten dabei ein Ergebnis (Abb. 15), das eindeutig zeigt, daß die Patulinvergiftung die Steigerung der $CO_2$-Abgabe um so mehr erhöht, als mehr Glycogen als Substrat von den Fermenten ergriffen werden kann. Die $O_2$-Aufnahme wird dabei in bezug auf die Kontrolle nur wenig gehemmt. Die Versuchsanordnung war folgende: Die Hefesuspension wurde während 24 Stunden bei 30° C zwölf Stunden lang zwecks Verarmung geschüttelt. Der so vorbehandelten Suspension wurde 1%ige Glucose zugegeben. Proben (darunter eine vor Glucosezusatz) wurden nach 15 und 60 Minuten entnommen, die Hefe abzentrifugiert, dreimal gewaschen und in dest. Wasser aufgeschlämmt. Eine mikroskopische Prüfung mit Jod-Jodkali zeigte bei den verschiedenen Proben verschiedene Glycogengehalte. Anschließend erfolgte die Gaswechselprüfung.

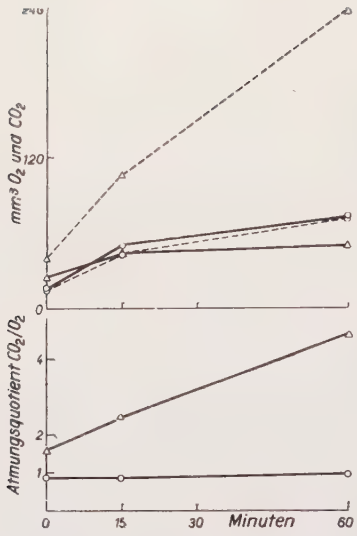



Abb. 15. Der Einfluß des Glycogengehaltes der Hefe auf die Größe der Eigenatmung und des Atmungsquotienten bei Patulinvergiftung

Ordinate der oberen Kurven: $O_2$-Aufnahme bzw. $CO_2$-Abgabe in $mm^3$

Ordinate der unteren Kurven: Größe des Atmungsquotienten in Einheiten

Abszisse beider Kurven: Zeit in Minuten, während der die hungernde Hefe mit Glucose vorbehandelt, d. h. während welcher Glycogen gebildet wurde

——— = $O_2$-Aufnahme
– – – = $CO_2$-Abgabe
0 = Kontrolle (ohne Patulin)
Δ = vergiftet (mit Patulin)

Versuchsbedingungen: Hefesuspension: 2 %; Patulinkonzentration: $10^{-2}$ Mol.; Temperatur: 30° C; Meßabschnitt: 90 bis 150 Minuten nach Patulinzusatz.

Bei der Kontrollkurve ist der Atmungsquotient zuerst etwas unter 1, um bei stärkerem Glycogenhalt auf 1 zu tendieren. Die absolute Atmungsintensität steigt natürlich und geht selbstverständlich einem Maximum entgegen. Bei der Vergiftung steigt die Größe des Atmungsquotienten mit dem Glycogengehalt, und zwar vor allem wegen der Steigerung der $CO_2$-Abgabe.

Es wurde eine weitere Frage geprüft: Wird der Hefe direkt eine Glycogenlösung verabreicht, so ist sie nicht imstande, diese zu verwenden. Wahrscheinlich vermag das Glycogen nicht einzudringen. Da Patulin die Zelle permeabilisiert, wurde versucht, das Glycogen der vergifteten Hefe zuzugeben; auch hier verlief der Versuch negativ.

## 6. Verschiedenes

Eine Erklärung für die große $CO_2$-Abgabe wurde in dem Herabsetzen des pH der Zelle unter dem Einfluß des reagierenden Patulins gesucht. (Im Modellversuch mit Cystein wurde ein Sinken der pH-Werte beobachtet, wenn das Cystein mit Patulin reagierte.) Das könnte ein Entweichen des im Plasma retenierten $CO_2$ verursachen. Bei einem mit Phosphat gepufferten Versuch mit einem pH-Wert von 4,5 wurden jedoch dieselben Ergebnisse erhalten, wie für die ungepufferte Suspension. Auch die pH-Schwankungen einer 2 %igen Suspension unter dem Einfluß des Patulins ($10^{-2}$molare Lösung) wurden geprüft. Es zeigte sich, daß das pH etwas sinkt (wie folgende Tabelle 15 veranschaulicht), aber zu wenig, um den Effekt zu erklären.

*Tabelle 15*

Die Veränderung des pH einer Hefesuspension unter dem Einfluß des Patulins

| Zeit in Minuten | pH-Werte | |
|---|---|---|
| | Probe I | Probe II |
| 0 | 5,68 | 6,40 |
| | Patulinzusatz | |
| 5 | 5,12 | 6,10 |
| 120 | 5,51 | 5,72 |
| 300 | 5,10 | 5,50 |

## 7. Diskussion

Aus den obengenannten Tatsachen wird folgende Hypothese aufgestellt: die Eigenatmung schlägt andere Wege ein als die Glucoseveratmung. Die Wirkung des Patulins auf die Fermentprozesse scheint wahrscheinlich zu sein, indem das Patulin die $O_2$-Aufnahme und $CO_2$-Abgabe ungleichmäßig beeinflußt. Es ist möglich, daß das Gift die geregelte Eigenatmung auf eine ungeregelte Stufe bringt, indem es Stoffe, die normalerweise veratmet werden, frei macht, und diese dann durch die Gärungsfermente ergriffen und verarbeitet werden können.

Eine andere Möglichkeit besteht auch in einer Anregung der Carboxylase-Aktivität, die durch die Dislokation der Zellproteine gespeicherte Substrate in großer Menge erhält. Karrer und Viscontini (1947) zeigen, daß die Cocarboxylase inaktiviert wird. Bei lebender Hefe ist es möglich, daß das Patulin die Carboxylase erst nach einigen Stunden erreicht und inaktiviert, daß aber in der Zwischenzeit eine Anregung stattfindet.

Eine Prüfung, ob eine Einwirkung auf den Pasteureffekt stattfindet, wird erschwert, da die Eigenatmung anaerob unterbunden ist. Überdies würde eine eingehende Prüfung dieser Tatsache den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

Zusammenfassend sei hervorgehoben, daß:

a) das Patulin die Fermentsysteme direkt beeinflußt;

b) der Vorgang der Vergiftung der Eigenatmung von demjenigen der Glucoseveratmung und -Gärung verschieden ist.

## Schlußfolgerungen und Zusammenfassung

### Diskussion

In der Einleitung haben wir auf die Eigenschaft des Patulins, sich mit SH-Gruppen zu verbinden, hingewiesen. SH- und -S-S-Körper befinden sich sowohl im Plasma, wo sie an der Struktur beteiligt sind, als in Form von Bestandteilen bestimmter Fermente. Diejenigen, die zur letzten Kategorie gehören, können nach Geiger

(1948) durch ungesättigte Ketone inaktiviert werden: „Enzymes with essential sulphhydryl groups, such as urease and succinic, alcohol and triose phosphate dehydrogenase." Noch allgemeiner schreibt Haurowitz (1948): „Durch Reagentien, welche die SH-Gruppen besetzten oder verändern, kann man auch folgende Fermente inaktivieren: Pyruvatoxydase, Karboxylase, Pankreaslipase, Aminosäureoxydase, Transaminase, Monoaminooxydase, ferner Fermente, welche die Oxydation von $\alpha$-Ketoglutarat, Malat, Stearat, $\beta$-Oxybutyrat, Azetat und Glutamat katalysieren."

Für die Einwirkung des Patulins schließt Miescher (1950): „Wenn vermittels des Phosphorwolframsäuretestes in der Pflanze ferner doppelt soviel SH-Gruppen nachgewiesen werden, als durch Patulin inaktiviert werden können, so läßt sich daraus schließen, daß die durch das Patulin nicht inaktivierten SH-Gruppen weniger reaktionsbereit sind, komplexeren Verbindungen angehören und deshalb wahrscheinlich auch weniger am Redoxpotential beteiligt sind." Um diese Hypothese zu unterstützen, sollen einige Tatsachen über das Vorkommen der SH-Gruppen mit ihren Eigenschaften näher betrachtet werden.

Es muß zwischen schwach gebundenen (löslichen) und strukturgebundenen Thiolen unterschieden werden. Der wichtigste Vertreter der ersten Art ist das Glutathion, das sowohl in der Thiolform als in der Disulfidform vorkommt. Über seine Eigenschaften und physiologische Funktion schreibt Vogel (1949): „Das Glutathion hat für den lebenden Organismus vielfältige Bedeutung und ist neben Cystein, das ja in anderen Organismen frei vorkommt, der wichtigste Baustein, welcher organisch gebundenen Schwefel enthält." „In der lebenden Zelle spielt das Glutathion die Rolle eines Hilfskatalysators bei enzymatischen Reaktionen." Eine Illustration zu dieser Hilfswirkung finden wir bei Haurowitz (1948), der bemerkt: „Es ist zuerst von Hopkins gezeigt worden, daß Sukzinodehydrogenase von der oxydativen Form des Glutathions inaktiviert, von der reduzierten Form reaktiviert wird."

Thiol- und Disulfidform können ineinander übergehen. Warburg (1948) schreibt: „Nach Hopkins gibt es in der Zelle Substanzen, die das oxydierte Glutathion wieder zu SH-Glutathion reduzieren, eine Beobachtung, die dafür spricht, daß Glutathion im Leben als Oxydationskatalysator wirkt." Miescher (1950) zeigte im Modellversuch, daß Patulin mit Glutathion reagiert und daß es dabei inaktiviert wird. Nun, wenn das Patulin sich mit dem Glutathion der Zellen verbindet, so ist dem bereits Gesagten nach leicht zu verstehen, daß dann die Rolle des Glutathions als Hilfskatalysator (z. B. Erhaltung des Redoxpotentials) vernichtet wird.

In unserer Untersuchung könnte dies bei der Glucose-Atmungs- und -Gärungshemmung der ersten Phase zum Vorschein kommen. Die Konzentrationsabhängigkeit der Patulinwirkung spricht dafür. Das Glutathion wird vom Patulin leicht erreicht.

Zur zweiten Art Thiolen gehören die strukturgebundenen, d. h. Thiolproteine. Bersin, zitiert in Bamann und Myrbäck (1941), schreibt: „Zwischen den Polypeptidketten der Eiweißmoleküle bestehen zahlreiche Verbindungen senkrecht zu der Richtung der Faltung. An der Ausbildung dieser Brückenverbindungen ist namentlich das Zystin mit seiner -S-S-Gruppe beteiligt, indem es gleichzeitig zwei Peptidketten angehört. Aus der Kette herausragende Glutaminylzysteinylreste oder Zysteinylreste sind die Ursache für das Auftreten der sogenannten ‚fixen HS-Gruppen'. -S-S- und SH-Gruppen können sich unter geeigneten Bedingungen oxydoreduktiv umsetzen, wodurch neue Kettenanordnungen, Aggregationen und Desaggregationen, verbunden mit einer Änderung der physiko-chemischen Eigenschaften des Proteins eintreten können." Die semipermeabilitätszerstörende Eigenschaft des Patulins könnte somit durch das Auflösen solcher Polypeptidketten-S-S-Brücken erklärt werden. Es verbindet sich mit den freien SH-Gruppen; dann erfolgt eine neue Kettenanordnung und eine Auflösung der -S-S-Brücken. Auch das Eindringen (Diffusion) in die Proteine könnte man sich so vorstellen.

Eine andere Eigenschaft der Thiolproteine macht eine solche Hypothese zulässig; denn nach Bersin (siehe oben) geschieht folgendes: „Bei der Denaturierung durch Hitze, Säure, Alkali, Alkohol, Harnstoff, Guanidiniumsalze, Salizylat und Ultraviolettbestrahlung können HS-Gruppen nachweisbar werden, die im nativen Molekül fehlen." Dort wären die nach Miescher (1950) komplexeren SH-Verbindungen zu suchen. Patulin denaturiert die Eiweiße im Laufe des Eindringens, -S-S-Verbindungen gehen in SH-Körper über, oder schon bestehende SH-Körper werden abgedeckt und können sich mit dem Gift verbinden; denn, nach Bersin: „Die reaktionsfähige SH-Gruppe der Thiolproteine bildet Merkaptide mit Schwermetallsalzen, wird durch Oxydationsmittel in die Disulfid-, Sulfoxyd-, Sulfon- und Sulfogruppe verwandelt, bildet Thioäther durch Anlagerung an aktive C=C oder C=O Doppelbindungen." „Durch derartige Umsetzungen können Nachbargruppen im Molekül in ihrer Reaktionsfähigkeit verändert werden, was in einer Änderung der katalytischen Aktivität zum Ausdruck kommen kann."

Im Gaswechsel könnte die Vergiftung der Thiolproteine, vor allem der neu entstehenden oder schwer erreichbaren SH-Gruppen, in der zweiten Phase zum Ausdruck kommen, wo eine langsame Zunahme der Hemmung erfolgt.

Die Hemmung ist verständlicherweise irreversibel. Nilsson, zitiert in Bamann und Myrbäck (1941), schreibt: „Irreversible Atmungshemmung wird erzeugt durch Zerstörung der Eiweißstrukturen durch Hitze, Säuren, Alkalien oder Eiweißfällungsmittel (Protoplasmagifte)."

Über die Eigenatmungsvergiftung kann ausgesagt werden, daß sie vor allem von der Substratmenge (Reservestoffe) abhängt. Denn nach WARBURG (1928) entsteht ein Maximum des Gaswechsels, wenn „die Oberfläche in der Zelle mit verbrennlicher Substanz gesättigt" ist. Nun könnte man sich die Giftwirkung auf die Eigenatmung so vorstellen, daß durch Angriff des Giftes die Eiweiße, die betroffen sind, denaturiert werden. Dabei werden die vergärbaren Stoffe, die daran absorbiert sind, frei gemacht (denn nach FREUNDLICH [1922] verkleinert sich die Adsorptionskapazität bei der Denaturierung) und gelangen in die Bezirke, wo die Carboxylase aktiv ist, womit eine Gärung entsteht. Daneben verläuft die normale Eigenatmung gehemmt weiter.

Warum die Glucosevergärung nicht wie die Eigenatmung reagiert, wäre zu verstehen, indem die Hemmung dieses Vorgangs die Bildung der Vorstufen (Substrat für die Carboxylase) durch Herabsetzung der katalytischen Eigenschaften des Plasmas verlangsamt.

Zusammenfassend kann der Mechanismus der Patulineinwirkung folgendermaßen verstanden werden: Das Patulin besetzt rasch die an der Oberfläche der Hefezelle stehenden freien SH-Gruppen (Glutathion usw.). Dann diffundiert es langsam in das Innere des Plasmas. Die Struktur-S-S-Brücken werden aufgelöst, indem mehr und mehr SH-Gruppen aufgedeckt und blockiert werden. Das Gift trifft dann auch direkt SH-Fermente.

Da die Reversibilität der Disulfide und Thiole im Gewebe möglich ist, könnte folgende Formulierung zulässig sein:

$$[\text{Patulin}] \underset{(1)}{\rightleftharpoons} [\text{-SH}] \underset{(2)}{\rightleftharpoons} [\text{-S — S-}]$$

Das Ganze ist ein Gleichgewichtsproblem. Reaktion (1) geht nach Massenwirkungsgesetz rasch vor sich, solange freie SH-Gruppen im Vorrat zur Verfügung stehen (erste Phase). Reaktion (2): durch Verminderung der SH-Gruppen werden unter der Einwirkung reduzierender Substanzen -S-S-Brücken allmählich aufgelöst, um das Verhältnis zwischen oxydiertem und reduziertem Schwefel aufrechtzuerhalten. Durch die so neu frei werdenden SH-Gruppen wäre das langsame Ansteigen der Hemmung des Gaswechsels in der zweiten Phase zu erklären, wie auch die zunehmende Aufnahme des Patulins, da das Gift ständig im Gleichgewicht (1) mit SH-Gruppen steht.

## Zusammenfassung

1. Es wurde der Einfluß des Patulins auf den Gaswechsel der Bäckerhefe untersucht.
2. Bei der Einwirkung von Patulinkonzentrationen von $10^{-2}$ Mol. und darunter kann mit der Methylblaumethode in der gegebenen Versuchszeit kein Absterben der Hefezellen nachgewiesen werden.
3. Bei Konzentrationen zwischen $10^{-4}$ und $10^{-2}$ Mol. ist die prozentuale Hemmung der Glucoseatmung und -Gärung ähnlich. Sie verläuft in

zwei Phasen: während der ersten Stunde nach der Patulinzugabe erfolgt eine rasche Hemmung (1. Phase), dann entsteht eine Gleichgewichtseinstellung (2. Phase). In dieser Phase nimmt die Hemmung nur sehr langsam zu (0,6 bis 1,6 % pro Stunde).

4. Die Hemmung der Atmungsintensität ist mit der Patulinkonzentration nach dem Massenwirkungsgesetz verbunden. (Schließt eine Wirkung durch reine Adsorptionsverdrängung, wie bei narkotischen Hemmungen, aus.)
5. Eine Vorbehandlung der Hefe, welche die Permeabilität derselben erhöht (Verarmung, Anaerobie), ist ohne jeglichen Einfluß auf die prozentuale Hemmung.
6. Das Patulin und die Glucose konkurrenzieren sich an der Oberfläche der Zellen nicht, d. h. das Patulin vermag nicht die glucoseabbauenden Fermente der ersten Stufe (Phosphorylierung) zu besetzen; umgekehrt kann die Anwesenheit der Glucose die hemmende Wirkung des Patulins nicht herabsetzen.
7. Der Verlauf der Patulinaufnahme steht in direkter Beziehung zur Hemmung der Glucoseatmung und -Gärung der Hefe.
8. Die 50%ige Hemmung wird bei jeder Patulinkonzentration durch die gleiche aufgenommene Patulinmenge verursacht (im zitierten Beispiel durch 851 mg pro Kilogramm Frischgewicht der Hefe).
9. Die Eigenatmung der Hefe verhält sich unter der Einwirkung des Patulins anders als die Glucoseatmung.
10. Bei der Eigenatmung ist mit einer schwachen Hemmung der $O_2$-Aufnahme eine starke Steigerung der $CO_2$-Abgabe zu beobachten.
11. Das Patulin wirkt allgemein als Plasmagift (eine unspezifische Wirkung).
12. Eine Methode zur quantitativen Patulinbestimmung auf fluorimetrischem Wege wurde entwickelt.

## Literaturverzeichnis


Althaus, H., 1950. Versuche über die Bildung von Glycogen in Hefezellen. Tätigkeitsber. Natf. Ges. Baselland **18**, 99—155.

Annual Review of Biochemistry (bis Band 1951).

Bamann und Myrbäck, 1941. Die Methoden der Fermentforschung (Bd. I—IV). Leipzig (Thieme).

Baron, A. L., 1950. Handbook of antibiotics. (Reinhold Publishing Corporation.) New York.

Broom et al. 1944. Zitiert in Florey.

Brzeski, O. W., 1949. Über das Patulin und einige andere antibiotisch wirksame Stoffwechselprodukte von Pilzen. Graz, Innsbruck, Wien (Diss. E. T. H. Akad. Druck u. Verl. Anstalt).

Cavallito, C. J. und Bailey, J. H., 1944. Preliminary note on the inactivation of antibiotics. Science **100**, 390.

— — und Haskell, T. H., 1945. The mechanism of action of antibiotics. Journ. Am. Chem. Soc. **67**, 1991.

DENNY, F. E., 1947. Semi-micro method for measuring the amount of oxygen consumed and carbon dioxide produced in plant respiration. Contributions from Boyce Thompson Institute **15**, 47—60.

DIXON, M., 1943. Manometric Methods. Cambridge (University Press).

FINK und KÜHLES, 1933. Beiträge zur Methylenblaufärbung der Hefezellen und Studien über die Permeabilität der Hefezellmembranen. II. Mitt.: Eine verbesserte Färbeflüssigkeit zur Erkennung von toten Hefezellen. Hoppe-Seylers Z. 218, 65.

FISHER, R. A., 1946. Statistical methods for research workers. 10. Ed. London (Oliver and Boyd).

FLOREY, H. W., CHAIN, E., HEATLEY, N. G., JENNINGS, M. A., SANDERS, A. G., ABRAHAM, E. P., FLOREY, M. E., 1949. Antibiotics. London, New York, Toronto (Oxford University Press).

FREUNDLICH, H., 1922. Kapillarchemie. Leipzig (Akad. Verl. Ges. m. b. H.).

GÄUMANN, E. und JAAG, O., 1947. Die physiologischen Grundlagen des parasitogenen Welkens I—III. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**.

— —, JAAG, O. und BRAUN, R., 1947. Antibiotika als pflanzliche Plasmagifte I. Exper. **3**, 70.

— — und VON ARX, A., 1947. Antibiotika als pflanzliche Plasmagifte II. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **57**, 174—183.

— —, 1951. Über den Einfluß der Temperatur auf den Welke-Effekt beim toxigenen Welken. Phytopath. Zeitschr. **17**, 1—4.

— —, NAEF-ROTH, ST., REUSSER, P. und AMMANNA., 1952. Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften der Zellen. Phytopath. Zeitschr. **19**, 160—220.

GEIGER, M., 1927. Studium zum Gaswechsel einer extremen Schattenpflanze und zur Methodik der Gaswechselversuche. Jahrb. f. wiss. Bot. **67**, 635—701.

GEIGER-HUBER, M., 1930. Über die Beeinflussung der Hefeatmung durch Neutralrot. Proc. Kon. Acad. V. Wetensch. **33**, 1059.

— —, 1934. Über den Einfluß der Konzentration des Atmungsmaterials auf die Atmungsgeschwindigkeit von Pflanzen. Jahrb. f. wiss. Bot. **81**, 1—34.

GEIGER, W. B., 1948. Antibacterial unsaturated ketones and their mode of action. Arch. of Biochem. **16**, 423—435.

— — und CONN, J. E., 1945. The mechanism of the antibiotic of clavatin and penicillic acid. Journ. Am. Chem. Soc. **67**, 112.

HAPPOLD and WALTERS (zitiert in FLOREY).

HAUROWITZ, F., 1948. Fortschritte der Biochemie. Basel, New York (KARGER).

HÖBER, R., 1947. Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe. Bern. (STÄMPFLI.) (Übersetzung von „Physical chemistry of cells and tissues" 1945. Philadelphia, Toronto.)

JIROVEC, O., 1949. Der Einfluß des Streptomycins und Patulins auf einige Protozoen. Exper. **5**, 74.

KARRER, P. und VISCONTINI, M., 1947. Einfluß verschiedener Zusätze auf die Wirksamkeit der Carboxylase. Helv. Chim. Acta. **30**, 268—271.

KATZMAN et al. 1944. (zitiert in FLOREY).

KEILOVA-RODOVA, H., 1949. The effect of patulin on tissue cultures. Exper. **5**, 242.

LARDY, H. A., 1950. Respiratory enzymes. Minneapolis (Burgess Publishing C.).

MIESCHER, G., 1950. Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen. Phytopath. Zeitschr. **16**, 369—397.

MUSFELD, W., 1942. Versuche über die Aufnahme von Zucker durch Hefezellen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **52**, 583—620.

RIEDER, H. P., 1951. Über die Zuckeraufnahme von Hefezellen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 539—622.

Runnström, J. und Sperber, E., 1938. Zur Kenntnis der Beziehungen zwischen Permeabilität und Stoffwechsel der Hefezelle. Biochem. Zeitschr. **298**, 340—367.

Seiler, L., 1951. Über das Wurzelwachstum und eine Methode zur quantitativen Untersuchung des Einflusses von Wirkstoffen. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **61**, 622—663.

Strugger, S., 1949. Praktikum der Zell- und Gewebephysiologie der Pflanze. Berlin, Göttingen, Heidelberg (Springer).

Thomas, P. 1946. Manuel de Biochimie. Paris (Masson & Cie).

Umbreit, W. W., Burris, R. H. and Stauffer, J. F., 1949. Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis (Burgess publishing Co.).

Ursprung, A., 1923. Vereinfachte Methode der Saugkraftmessung. Ber. Deutsch. Bot. Ges. **41**, 338.

Vogel, H., 1951. Die Antibiotika. Nürnberg (Hans Carl).

Warburg, O., 1926. Über den Stoffwechsel der Tumoren. Berlin (Springer).

— —, 1928. Über die katalytischen Wirkungen der lebenden Substanz. Berlin (Springer).

— —, 1948. Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten. Berlin (Saenger).

Willstätter, R. und Stoll, A., 1918. Untersuchung über die Assimilation der Kohlensäure. Berlin (Springer).

Woodward, R. B. and Singh, G., 1950. Zitiert in Vogel.

# Besprechungen

**Elliott, Ch(arlotte),** Manual of Bacterial Plant Pathogens. (Annales Cryptogamici et Phytopathologici, vol. 10.) 2. Aufl., VIII + 186 S., 1951. Waltham, Mass.: The Chronica Botanica Co.; Hamburg 13, Buch- und Zeitschriften-Union m. b. H. Preis 6,00 Dollar.

Die vorliegende, völlig neu bearbeitete Zweitauflage des bekannten Elliottschen Buches ist diesmal nur in zwei Teile gegliedert, von denen der erste und wichtigste Teil auf insgesamt 152 Seiten alle diejenigen pflanzenpathogenen Bakterienarten umfaßt, die in der Literatur ausreichend beschrieben und als solche anerkannt worden sind. Dabei hat sich die Verfasserin in fast allen Fällen der neuen Nomenklatur, wie sie in der 6. Auflage der Bakteriensystematik des „Bergey" niedergelegt ist, angeschlossen. Sie beginnt in diesem Teil mit der Besprechung der Vertreter des neuesten Genus *Agrobakterium,* dann folgen diejenigen der Genera *Bacterium, Corynebacterium, Erwinia, Pseudomonas* und *Xanthomonas.* Im zweiten Teil haben alle diejenigen Bakterienspezies Aufnahme gefunden, die zwar im Schrifttum vorhanden sind, aber als echte Pflanzenkrankheitserreger bisher nicht rekognosziert werden konnten.

Von den einzelnen bakteriellen Erregern werden — in geringer Abänderung gegenüber der Erstauflage — zunächst die Synonyme, dann ihre morphologischen, kulturellen und physiologischen Eigenschaften, die von ihnen hervorgerufenen Krankheitssymptome, die geographische Verbreitung der Krankheit, die Bekämpfungsmaßnahmen und schließlich die Literaturhinweise gebracht.

Obwohl zwischen der Erst- und der Zweitauflage ein Zeitraum von 21 Jahren liegt und das Schrifttum auf diesem bakteriologischen Spezialgebiet innerhalb dieser Zeitspanne enorm angewachsen ist, hat sich der Umfang der zweiten Auflage, abgesehen von dem etwas größeren Buchformat, nicht erhöht, sondern sogar verringert. Die Beschränkung ist u. a. dadurch möglich geworden, daß Verfn. auf die Wiedergabe der älteren Literatur verzichtet hat und dieserhalb auf die erste Auflage verweist; die neuere beginnt zumeist mit dem Jahre 1929 oder 1930, sofern der bakterielle Erreger nicht noch später erstmalig beschrieben worden ist. Nur in einigen Ausnahmefällen, so z. B. bei *Erwinia carotovora* ab 1892. Während jedoch in der Erstauflage die bis dahin vorhandene Literatur ziemlich vollständig gebracht wurde, ist diesmal nur die wichtigere zitiert worden. Wahrscheinlich aus Gründen der weiteren Raumersparnis fehlen diesmal auch in den jeweiligen Literaturverzeichnissen die kurzen Erläuterungen über bedeutsame Untersuchungsergebnisse vollständig. Dagegen befinden sich bei der Einzelbeschreibung der Erreger wie früher wieder kurze Hinweise auf Differenzen, was an einem Beispiel, nämlich *Erwinia amylovora,* erläutert sei:

Rods 0,7—1,0 × 0,9—1,5 $\mu$ (L. R. Jones); 0,5—0,9 × 1,0—1,85 $\mu$ (D. H. Jones); 0,93—1,71 $\mu$ long (Ark 1937). Thermal death point 43,7 ° C (L. R. Jones); 45—46 ° C (Erwin F. Smith); 45,1—49,5 ° C (Hildebrand).

Derartige und andere Abweichungen sind bei einer Reihe von Spezies aufgeführt, wenn auch nicht immer ganz vollständig.

Warum Verfn. *Bact. phytophthorum* Appel einmal als Synonym von *Erwinia atroseptica,* zum anderen aber auch von *Erwinia carotovora* aufführt, wird nicht begründet, es scheint aber, daß es als Erreger der Schwarzbeinigkeit der Kartoffeln mit ersterem und als Erreger der Knollennaßfäule mit dem letzteren synonym angesehen wird, was beides durchaus anfechtbar ist.

Im zweiten, nur 18 Seiten langen Teil sind u. a. aufgeführt *Bacillus betae* Busse, *Bac. cerealium* Gentner, *Bac. lathyri* Manns and Taubenhaus, *Bac. maculicola* Delacroix, *Bac. populi* Brizi, *Bacterium lycopersici* Burgwitz, *Bact. rubefaciens* Burr, *Micrococcus ulmi* Brussoff, *Pseudomonas musae* Gäumann und *Pseud. solaniolens* Paine.

Ein Index über Wirtspflanzen und ein zweiter über die bakteriellen Erreger beschließen das in vieler Hinsicht wirklich wertvolle Buch, für das wir der Autorin zu Dank verpflichtet sind, schon deshalb, weil es uns auch mit der wichtigen einschlägigen Literatur besonders des Auslandes bis in die neueste Zeit bekannt macht.

Stapp

**Gäumann, E.,** Pflanzliche Infektionslehre, Lehrb. u. Monograph. a. d. Gebiet der exakten Wiss., Reihe exper. Biologie Bd. I, 2. Auflage, Verlag Birkhäuser-Basel, 1951. 681 S. Preis geb. Fr. 44,50.

Die vorliegende „Pflanzliche Infektionslehre" stellt die zweite Auflage des 1946 erschienenen Werkes dar. Es ist ein erfreuliches Zeichen, wenn ein solches Buch schon nach fünf Jahren eine Neuauflage erfährt, doppelt erfreulich, weil der Verfasser die Gelegenheit wahrgenommen hat, das internationale Schrifttum der letzten zehn Jahre einzuarbeiten, das wegen der durch den zweiten Weltkrieg bedingten Abschnürung der Schweiz vom geistigen Leben der übrigen Welt in der ersten Auflage nicht berücksichtigt werden konnte. Hieraus und aus den notwendig gewordenen Umarbeitungen ergibt sich eine Steigerung des Buchumfanges von 572 auf 634 Seiten. Beträchtlich ist vor allem die Zahl der neuen Abbildungen, die von 311 auf 467, also auf etwa das Eineinhalbfache der bisherigen Zahl erhöht ist; an Tabellen sind 17 neu hinzugekommen. Die stärkste Steigerung an Abbildungen und Tabellen weisen die Kapitel 2 (Die Infektketten) mit 58 Abbildungen und 6 Tabellen und Kapitel 5 (Die Erkrankung) mit 35 Abbildungen und 4 Tabellen auf.

Tendenz des Werkes und Einteilung sind die gleichen geblieben. Nach wie vor kommt es dem Verfasser darauf an, die allgemeinen Gesetze der pflanzlichen Infektion klarzulegen, sie für die verschiedenen Erreger, also Virus, Bakterien, Pilze und parasitäre höhere Pflanzen, von einheitlichen Gesichtspunkten aus zu beleuchten und zur menschlichen und tierischen Infektionslehre in Beziehung zu bringen. Die bewunderungswerte Literaturkenntnis des Verfassers befähigt ihn, in Verbindung mit seiner Gabe, auch komplizierte Fragen klar und übersichtlich darzustellen, das Wesentliche vom Unwesentlichen zu trennen und aus dem großen Beobachtungsmaterial überall die wichtigen und besonders charakteristischen Beispiele herauszufinden und als Grundlage einer wirklich „Allgemeinen" Infektionslehre zu benutzen, die es gestattet, nicht nur in das parasitische Verhältnis von Wirt und Krankheitserreger einen Einblick zu gewinnen, sondern darüber hinaus auch das symbiontische Verhältnis von Pflanze und nützlichen Mikroorganismen in den Kreis der Betrachtungen einzubeziehen.

Das Buch von Gäumann ist jedem zu empfehlen, der sich irgendwie mit pflanzenpathologischen Problemen zu beschäftigen hat. Es führt ganz von selbst über die speziellen Fragen der einzelnen Krankheitserreger hinaus zu einer allgemeinen Betrachtung der in Frage stehenden Probleme und wird darum weitgehend anregend wirken und dazu beitragen, in Zukunft den allgemeinen Problemen der Infektion, auch in den in Spezialuntersuchungen behandelten Einzelfällen den gebührenden Platz einzuräumen. Die ständigen Hinweise auf Parallelen oder Divergenzen zu menschlichen und tierischen Infektionskrankheiten dienen zur besonderen Vertiefung der in Frage stehenden Probleme, zumal es bisher meist an einer scharfen Definition der vielfach aus der menschlichen und tierischen Krankheitslehre übernommenen Beziehungen gefehlt hat.

Die Ausführungen des Werkes verraten überall die ausgesprochene Forscherpersönlichkeit des Verfassers. Man kann in dem einen oder anderen Fall anderer Meinung sein — in der Gesamtbeurteilung aber werden sich sicher alle Leser dahin einig sein, daß hier ein überaus verdienstvolles Werk geschaffen ist, das sich zum Segen der phytopathologischen Wissenschaft auswirken wird.

In seinem Vorwort bittet der Verfasser um Hinweise und Ratschläge für die Zukunft. Die Übersichtlichkeit des Werkes, insbesondere der sehr umfangreichen Kapitel 2 und 4, läßt sich vielleicht dadurch noch verbessern, daß in den Beispielen der einzelnen Unterabschnitte jeweils die gleiche, nach Erregern geordnete Reihenfolge innegehalten wird.

Und nun noch eine kurze Bemerkung. Bei der Besprechung der Keimlingsinfektion wird auf Seite 77 ausgeführt, daß bei der Bildung der Brandbutten die Hyphen von *Tilletia* in die Samenanlage eindringen, die Reservestoffe des jungen

Endosperms verzehren, den Embryo zerstören und dann zur Sporenbildung übergehen. In Wirklichkeit stellen die Steinbrandbutten innere Auswüchse der Fruchtwand dar, die so kräftig sind, daß Endosperm und Embryo verdrängt werden und überhaupt nicht zur Entwicklung kommen.

Referent möchte die vorliegende Besprechung nicht schließen, ohne dem Verfasser nochmals für das ausgezeichnete Werk zu danken, das er der phytopathologischen Wissenschaft und allen, die sich mit Fragen der pflanzlichen Infektionslehre zu befassen haben, geschenkt hat. Ausstattung des Werkes und vor allem die Wiedergabe der Abbildungen sind hervorragend. GASSNER

**Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle.** 2. Colloquium der Deutschen Gesellschaft für physiologische Chemie am 6./7. April 1951 in Mosbach (Baden). Mit 25 Textabbildungen IV, 102 Seiten 8°. 1952. Ladenpreis: 9,60 DM.

Die moderne Forschung hat zur Ausarbeitung wirksamer chemischer, physikalischer und biologischer Methoden geführt, mit deren Hilfe die Kenntnis der Zellstrukturen hinsichtlich Bau und Funktion schwungvollen Auftrieb erfahren hat. Die vorliegende Schrift setzt sich aus Vorträgen zusammen, in denen namhafte Forscher der Physiologie, Biochemie und Mikrobiologie — F. E. LEHMANN, Bern, K. LANG, Mainz, K. FELIX, Frankfurt (Main), G. SCHRAMM, Tübingen, und G. PIEKARSKI, Bonn — den neuesten Stand der Zellforschung vermitteln. Zellkern, Mitochondrien, Mikrosomen und Plasma sind dank moderner Methodik in ihrer Lebendstruktur weitgehend der Erforschung zugänglich. Über den Ort der Bildung und über die Struktur der Nukleoproteide, ihrer Spaltstücke, besonders der beiden großen Gruppen, der Desoxyribonukleinsäure und der Ribonukleinsäure, können wesentliche Aussagen gemacht werden. Der Vergleich von Zellstrukturen höherer Organismen mit denen der Bakterien und der Cyanophyceen hat sich als besonders fruchtbringend erwiesen. Ist es doch so gelungen, exakte Anschauung von der Lokalisation der Desoxyribonukleinsäure und der Ribonukleinsäure im Nukleoid- und Karyoidsystem zu gewinnen. Von besonderem Interesse für den Phytopathologen sind vergleichende Hinweise auf den Bau des Viruseiweiß. Diskussionsbemerkungen und Literaturangaben am Schluß jedes Vortrags bilden eine wertvolle Abrundung. So ist die Schrift dazu angetan, alle biologischen Arbeiten, in deren Mittelpunkt das Zellgeschehen steht, sehr wesentlich zu fördern.

W. HEUMANN

*Aus dem Phytopathologischen Institut der Universität Halle und der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem*

# Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate, eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit

Von

M. Klinkowski und H. A. Uschdraweit

*Mit 4 Abbildungen*

Die Viruskrankheiten der Tomate haben in Deutschland bisher keine nennenswerte Beachtung gefunden, da man die wirtschaftliche Bedeutung dieser Krankheiten gering veranschlagte. Es unterliegt jedoch keinem Zweifel, daß ständige und nicht unbeträchtliche Ertragsausfälle bei Tomaten durch Viruskrankheiten verursacht werden, und daß wohl in jedem größeren Feldbestand ein nicht unerheblicher Prozentsatz viruskranker Pflanzen angetroffen werden kann. Wir haben es hier, wie bei vielen Virosen, mit einem Krankheitskomplex zu tun, der in steigendem Maße Beachtung verlangt. Vom Blickfeld des Berliner Anbaugebietes und seiner Umgebung ausgehend, sind einzelne Faktoren dieses Komplexes erst unlängst näher analysiert worden (Uschdraweit, 1951). Es liegt durchaus im Bereich der Möglichkeit, daß zukünftig die Zahl der Tomatenvirosen, in dem genannten Gebiet und darüber hinaus, eine weitere Vermehrung erfährt, und damit die wirtschaftliche Bedeutung dieser Frage noch deutlicher in Erscheinung tritt. Diese Vermutung liegt um so näher, weil in einem anderen deutschen Anbaugebiet — wenn zunächst auch nur sporadisch — eine bisher in Deutschland nicht bekannte Viruskrankheit der Tomate nachgewiesen werden konnte, deren Einbürgerung zu einer schweren Gefährdung der Tomatenkultur führen würde. Hierüber soll nachstehend näher berichtet werden.

Im Frühsommer des Jahres 1950 wurden von einem mitteldeutschen Gartenbaubetrieb in Könnern (Saalkreis) stark geschädigte und teilweise im Absterben begriffene Tomatenpflanzen dem Pflanzenschutzamt des Landes Sachsen-Anhalt in Halle übersandt und von diesem dem Phytopathologischen Institut übergeben. Eine am Standort selbst unternommene Untersuchung führte zu dem Ergebnis, daß eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit vorlag. Material dieser Herkunft, das eingehenden Untersuchungen unterworfen wurde, ergab die Identität dieser Virose mit der sogenannten Bronzefleckenkrankheit *(Lethum australiense* var.

*typicum* Holmes; *Lycopersicum* virus 3 Brittlebank nach K. M. SMITH, 1937). In der anglo-amerikanischen Literatur wird diese Krankheit als „spotted wilt", „T.S.W.", seltener als „black pest" bezeichnet. In Neuseeland spricht man von „stripe", „bronze-top" und „brown top". Im argentinischen Anbaugebiet sind die gebräuchlichsten Vulgärnamen der Krankheit „peste negra" (bei Tomate) bzw. „corcova" (bei Tabak), in Brasilien „vira-cabeca", in Frankreich „maladie bronzée" oder „tâches bronzées".

Ein Stamm des Virus, der weiter unten ausführlich behandelt wird, führt den Namen „die-back streak" oder „tip-blight disease". In Südafrika nennt man eine Krankheit des Tabaks, die durch dasselbe Virus hervorgerufen wird, „kromnek" oder „Kat river disease". Schon SMITH (1937) vermutete, daß eine Ananasvirose, von ihm als *Ananas* virus 1 Linford benannt, auch dem Virus der Bronzefleckenkrankheit zuzuschreiben sei. Untersuchungen von SAKIMURA haben die Identität beider Viren erwiesen. Für diese Erscheinungsform findet man die Ausdrücke „pineapple yellow spot" und „pineapple side rot".

Die Bronzefleckenkrankheit, die 1915 in Australien erstmalig festgestellt wurde (BRITTLEBANK, 1919), ist inzwischen über weite Teile der Erde verbreitet und scheint auch heute noch eine progressive Tendenz zu besitzen. Die derzeit bekannte Verbreitung ist aus nachstehender Übersicht ersichtlich.

Verbreitungsgebiet der Bronzefleckenkrankheit

| Erdteil | Länder |
|---|---|
| Australien und Ozeanien | Victoria, Neusüdwales, West- und Südaustralien, Tasmania, Queensland, Hawaii |
| Amerika | USA: Westvirginia, California, New Jersey, Nebraska, New York, Maryland, Wisconsin, Utah, Oregon<br>Kanada: Quebec, Ontario, Saskatchewan, Manitoba<br>Brasilien, Argentinien |
| Europa | England, Irland, Frankreich, Belgien, Holland, Italien, Schweden, Deutschland, UdSSR (Grusinische Republik) |
| Afrika | Südafrika, Südrhodesien, Tanganyika |
| Asien | Indien (Zentralprovinzen), China (Chengtu) |

Was die wirtschaftliche Bedeutung der Bronzefleckenkrankheit anbelangt, so liegen eine größere Anzahl von Angaben vor, die deutlich unter Beweis stellen, daß sehr erhebliche Ertragsausfälle verursacht werden können. So betrug in bestimmten Bezirken von Neusüdwales die Infektion bis zu 90 % (1928), und in den Jahren 1935/36 wurde aus Neuseeland über Totalbefall berichtet, insbesondere jede spät gepflanzte Tomate war infiziert. 1929 wurde in gewissen Küstengebieten Kaliforniens von einer Krise des Tomatenanbaues gesprochen, die dazu zwang, den Anbau in diesen Gebieten zunächst aufzugeben. Während im Mittel des gesamten Küstengebietes die Infektion Werte bis zu 50 % erreichte, betrug der Befall in den trockneren und wärmeren Gebieten des Inneren durchschnittlich nur 10 %. Im nordameri-

kanischen Staate West Virginia wird in zwei aufeinanderfolgenden Jahren von Ernteminderungen von 50 % gesprochen. Am Stadtrand von Tiflis (Grusinische SSR), wo die Tomate für einen längeren Zeitraum ohne Fruchtwechsel angebaut worden ist, wird ein Befall bis zu 58,7 % berichtet. Man könnte noch eine Reihe weiterer Zahlenbeispiele anführen, die die wirtschaftliche Bedeutung dieser Viruskrankheit unterstreichen. Die vorliegenden Angaben erscheinen jedoch ausreichend genug, die Auffassung zu rechtfertigen, daß dieser Viruskrankheit eine große, ja wohl die größte Bedeutung überhaupt unter den Tomatenvirosen zukommt. Die Bedeutung dieser Krankheit wird noch dadurch wirksam unterstrichen, daß bei den meisten anderen Tomatenvirosen der Befall zu Wachstumshemmungen, aber nicht zu letalen Effekten führt, während bei der Bronzefleckenkrankheit ein partielles oder

Abb. 1. Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate (Sorte Rheinlands Ruhm). In der Mitte beginnende Bronzefleckenbildung in der Spitzenregion des Haupttriebes. Links (von oben nach unten): fortschreitende Krankheitsentwicklung am einzelnen Fiederblatt, charakterisiert durch Vertrocknen, Brüchigwerden und Einrollen. Rechts unten: Absterben des Haupttriebes vom Vegetationspunkt aus beginnend, unter gleichzeitiger Nekrosenbildung am Stengel und an den Blattstielen. Rechts oben: in der Entwicklung befindliche Früchte von bronzefleckenkranken Pflanzen mit Buckelbildung und der Bildung von konzentrischen Ringen

Abb. 2. Durch Pfropfung infizierte Tomatenpflanze (Sorte „Immun")

totales Absterben die Regel zu sein pflegt. Ihre zum Teil sehr große Bedeutung für andere Kulturen wie Ananas, Tabak, Kartoffeln und Zierpflanzen *(Papaver nudicaule, Zantedeschia, Dahlia* u. a.) sei nur erwähnt.

Als erstes charakteristisches Symptom ist eine plötzliche Bronzefärbung der jungen Blätter, vom Ende der Blattspreite beginnend, zu beobachten, die sich in Form runder, eckiger oder ungleichmäßiger nekrotischer Stellen auf den Blättern manifestiert. Diese Flecke, Kreise oder Ringe können 2 bis 6 cm groß sein und weisen eine deutlich erkennbare konzentrische Zonung auf. Im Zeitpunkt dieser Fleckenbildung kommt es zu einem nahezu vollständigen Wachstumsstillstand. Bei der Bronzefärbung ist die Schnelligkeit der Symptomänderung bemerkenswert; im Verlauf weniger Stunden kann es zu einer Verstärkung kommen, wobei gelegentlich eine verstärkte Ringbildung festzustellen ist, die sich oft sehr scharf auf der Blattoberseite abhebt. Die genannten Verfärbungen fließen später zusammen, erfassen die Blattadern und bewirken teilweises oder völliges Vertrocknen des Blattes,

Abb. 3. Blätter der Sorte Immun mit typischen Bronzeflecken

das sich unter Einrollen nach unten umbiegt. Bei erkrankten Pflanzen kommt es meist zu einer verstärkten Seitentriebbildung, wobei auf den Blättern des jungen Zuwachses die nekrotischen Blattverfärbungen in Gestalt zickzackförmiger, unterbrochener Linien, hauptsächlich längs der Hauptader, verlaufen. Die Bronzefärbung variiert von grünlichbraun bis dunkelbraun und ist in ihrem zeitlichen Verlauf stark witterungsabhängig, so ist sie z. B. bei trüber Witterung wesentlich länger zu beobachten. Mit Sichtbarwerden der ersten Symptome setzt ein schneller Krankheitsverlauf ein. Im Verlauf einer Woche wird der obere Teil (etwa 30 cm) einer Tomatenpflanze, auf dessen Stengeln und Blattstielen anfangs braune unterbrochene Linien, Streifen und Striche auftraten, bald trocken und brüchig, wobei der Vertrocknungsprozeß von der Sproßspitze aus seinen Fortgang nimmt. Die älteren Blätter werden dabei wenig oder gar nicht verändert.

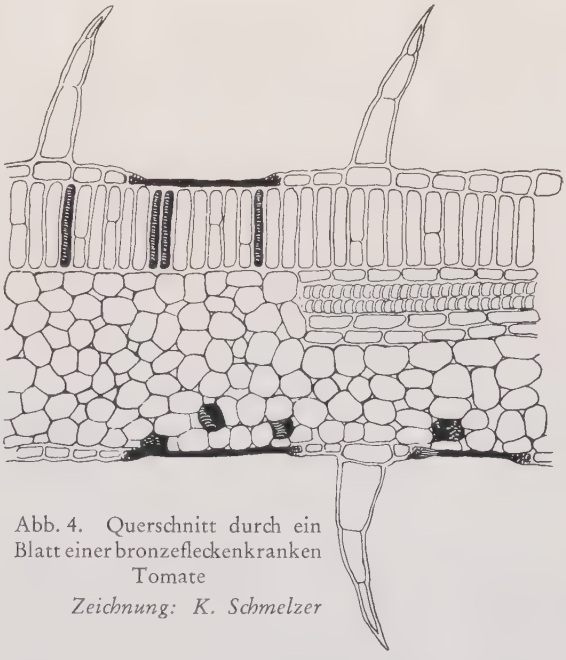


Abb. 4. Querschnitt durch ein Blatt einer bronzefleckenkranken Tomate
*Zeichnung: K. Schmelzer*

Die bronzefarbenen Flecke kommen dadurch zustande, daß die Epidermiszellen streckenweise absterben, wobei sie unter Braunfärbung des Inhaltes und der Wände zusammenschrumpfen. An Stelle der Epidermis entsteht eine dünne braune Deckschicht über dem Mesophyll. In einem fortgeschrittenen Stadium wird auch das Mesophyll nekrotisch, es entstehen dann eingesunkene braune Flecke oder Streifen. Nach DUFRÉNOY ist dies die Folge von Oxydationsprozessen, wobei Phenolverbindungen entstehen. Durch unterschiedliche Ernährung kann die Nekrosenbildung stark modifiziert werden, so begünstigen Kalium und Phosphor die Ausbildung von Nekrosen, während bei reichlicher Stickstoffdüngung das Virus systemisch wird, es also nicht zur Ausbildung von Nekrosen kommt. Auf die Symptomausprägung als ganzes betrachtet, hat auch Ca einen Einfluß, wobei es mit steigenden Ca-Gaben zu immer schwächerer Symptomausbildung kommt. In ursächlichem Zusammenhang mit der Bronzefärbung steht eine Reduktion des Trockengewichtes, der Blattfläche, der Blattentwicklung und des Wassergehaltes. Trockengewichtsminderung und Wachstumshemmung sind als Folge einer direkten Virusauswirkung zu betrachten, wobei die Trockengewichtsminderung durch partielle Desorganisation und Reduktion in der Wirksamkeit der Assimilationsgewebe zustande kommt, während die Hemmung des

Größenwachstums auf Zerstörung der Wuchshormone zurückgeführt wird. Kranke Pflanzen sind etwa 40 % kleiner, und ihre Blattzahl ist oft bis zu einem Drittel reduziert. In wärmeren Gebieten folgen den Frühnekrosen Wachstumshemmung, Scheckung und Blattverdrehung, während in kühleren Gebieten ein Absterben der Pflanzen unter gleichzeitiger Strichelbildung stattfindet. Eine weitgehende Modifikation der Symptome ist möglich und kann auf das Vorhandensein verschiedener Stämme dieses Virus, auf abnorme Bodenbedingungen (z. B. Kalkmangel) und meteorologische Faktoren zurückgeführt werden. So ist z. B. in Abhängigkeit von Umweltverhältnissen das symptomatologische Bild im Südwesten Frankreichs ein grundlegend anderes als im Südosten. Auch aus Großbritannien wird über eine Aberration berichtet, wobei die Bronzeflecke überhaupt nicht oder nur sehr schwach gebildet werden. Die Blattentwicklung ist dann unregelmäßig, die jungen Blätter sind verdreht. Diese Erscheinungen sind mit deutlichen Wachstumshemmungen verbunden. Bei getopften Pflanzen ist an Stelle der normalen Bronzefärbung oft nur eine Scheckung zu beobachten, die durch Änderungen im Wirtsstoffwechsel und in der relativen Virusaktivität zu erklären ist. Die Gewichtsreduktion ist in derartigen Fällen gering, eine Hemmung des Größenwachstums findet dann nicht statt.

Der Fruchtbefall richtet sich nach dem Zeitpunkt der Infektion. Ältere Früchte können schadenfrei bleiben. In anderen Fällen sind auf der grünen Frucht gelbe oder braune Linien zu sehen, die von der Ansatzstelle der Frucht ausgehen. Häufig ist auch die Bildung konzentrischer Ringe gleicher Färbung. Derartige Früchte sind bei der Reife anormal gefärbt, sie entwickeln sich nicht zu normaler Größe, so daß erkrankte Pflanzen nur Früchte kleiner oder mittlerer Größe liefern. Oft führt die Erkrankung zu einer früheren Reife, jedoch sind dann bei der zweiten und dritten Pflücke keine reifen Früchte mehr vorhanden. Die Tomatenfrucht ist auch in ihrer Qualität gemindert, da sie einen unangenehm süßlichen Beigeschmack aufweist. Auch Konsistenzänderungen sind feststellbar, so sind die Früchte an den rot gefärbten Stellen saftig, während sie an gelben Stellen fester sind. Einen näheren Anhaltspunkt vermittelt nachstehende Übersicht der chemischen Analysenwerte kranker und gesunder Früchte (ERISTAVI, 1941).

| Analysenwerte kranker und gesunder Tomatenfrüchte | gesund reif | gesund halbreif | krank |
|---|---|---|---|
| Feuchtigkeit | 93.31 | 94.04 | 94.19 |
| Trockensubstanz | 6.29 | 5.96 | 5.81 |
| Asche | 0.53 | 0.74 | 0.58 |
| Invertzucker (Traubenzucker) | 3.52 | 3.15 | 2.87 |
| Saccharose | 0.23 | 0.20 | 0.14 |
| Gesamtzuckermenge | 3.75 | 3.35 | 3.01 |
| Gerbstoffe | 0.021 | 0.021 | 0.013 |
| Säurezahl, bezogen auf Zitronensäure | 0.48 | 0.60 | 0.30 |
| Zellulose | 0.87 | 1.00 | 1.02 |
| Kjeldahl-Stickstoff | 0.13 | 0.122 | 0.14 |
| Eiweißstickstoff | 0.10 | 0.104 | 0.098 |
| anderer Stickstoff | 0.03 | 0.018 | 0.042 |
| Eiweiß | 0.81 | 0.76 | 0.87 |
| Vitamin C | 11.20 | 20.10 | 14.94 |

Bei Pfropfung auf eine kranke Unterlage treten sieben Tage nach erfolgter Pfropfung die ersten Nekrosen auf. Es wird angenommen, daß das Virus aus der infizierten Unterlage in das gesunde Reis eindringt, bevor die eigentliche Verwachsung stattgefunden hat. Die mechanische Übertragung gelingt nicht immer leicht, so verläuft leichtes oder kräftiges Einreiben der Blattoberfläche mit getränkten Wattebäuschen oder mit in Preßsaft getauchten Glasspateln in der Regel negativ. Bei zusätzlicher Verwendung von Karborund bzw. feinem Quarzsand ist dagegen bei Temperaturen von 22° C bei jungen, kräftig wachsenden Pflanzen eine hundertprozentige Übertragung zu erzielen. Hierbei ist es wichtig, daß die Übertragung wenige Minuten nach der Extraktion des Preßsaftes erfolgt, da beim Virus der Bronzefleckenkrankheit eine rasche Inaktivierung, meist innerhalb einer Stunde, einsetzt. Auch die Injektion infizierten Preßsaftes in die Stengel junger Pflanzen verläuft erfolgreich, wenngleich in sehr viel geringeren Prozentsätzen. Ebenso gelingt eine Übertragung in kleinem Ausmaß durch *Cuscuta subinclusa, C. campestris* und *C. californica*. Übertragung beim Ausgeizen durch infizierte Hände und Messer ist möglich, aber von weit geringerer Bedeutung als bei dem sehr viel infektiöserem Tabakmosaik. Um die Frage der Samenübertragbarkeit zu prüfen, wurden von kranken Tomatenpflanzen Früchte mit deutlichen Krankheitssymptomen geerntet. Bei stärker erkrankten Früchten war eine Samenernte nicht möglich, da in derartigen Früchten entweder überhaupt keine Ausbildung der Samen erfolgt war oder diese zumindest unvollkommen zur Ausbildung gelangt waren. Bei relativ geringer erkrankten Früchten kamen diejenigen Samen im Frühjahr zur Auslage, die auf ihrer Samenschale braune Flecke aufwiesen und bei denen am ehesten mit der Möglichkeit einer Samenübertragung zu rechnen war. Die aus diesen Samen sich entwickelnden Pflanzen wurden zu gegebener Zeit aufs Feld gepflanzt und dort bis zur Reife der Früchte beobachtet. In keinem Fall waren Symptome der Bronzefleckenkrankheit zu beobachten, so daß sich auch in unseren Versuchen eine Bestätigung dafür ergab, daß die Bronzefleckenkrankheit nicht samenübertragbar ist.

Als Insektenüberträger kommen ausschließlich Blasenfüße in Betracht. Es werden als Überträger genannt: *Thrips tabaci* Lind., *Frankliniella nigripes* Girault (= *F. insularis* Frankl.), *F. moultoni* Hood, *F. occidentalis* Perg., *F. paucispinosa* Moult., *F. schultzei* Trybom und *Liothrips pistaciae* Kreutzb. Nicht eindeutig erwiesen ist die Übertragungsmöglichkeit für *Thrips abdominalis Crwf.* und *Haplothrips gowdeyi* Frankl. An den Saugstellen kommt es zur Entwicklung lokaler, schwarzer, nekrotischer Flecke, die dort sechs bis sieben Tage früher in Erscheinung treten als die typischen Symptome an den terminalen Blättern.

Smith gibt als Testpflanzen zur raschen Identifizierung *Petunia* und *Nicotiana glutinosa* an. In eigenen Versuchen hat sich besonders *N. glutinosa* bewährt. Bei Abreibungen mit krankem Preßsaft auf den Blättern dieser Pflanze erschienen nach etwa vier Tagen Lokalläsionen, die zuerst durchscheinend sind, dann eine helle Mitte mit einem dunklen nekrotischen Rand zeigen. Diese Flecke vergrößern sich allmählich, häufig unter Ausbildung

konzentrischer Ringe, bis zu einem Durchmesser von 4 bis 5 mm. Sie sind gut von den sonst recht ähnlichen Lokalläsionen des gewöhnlichen Tabakmosaiks auf *Nicotiana glutinosa* zu unterscheiden. Mit Hilfe dieser Testpflanze gelingt es also, auch Mischungen beider Viren, die bei einigen uns vorliegenden Pflanzen auftraten, festzustellen. Später führen die Infektionen mit dem Virus der Bronzefleckenkrankheit meist zum Absterben der *N. glutinosa*-Pflanzen.

Was die physikalischen Eigenschaften des Virus der Bronzefleckenkrankheit anbelangt, so ist hier zunächst als besonders bemerkenswert die niedrige Inaktivierungstemperatur zu nennen. MILBRATH (1939 und 1942) gibt hier eine Temperaturspanne von 40 bis 41,5 ° C an, BALD und SAMUEL (1931) und SMITH (1937) nennen 42 ° C, AINSWORTH, BERKELEY und CALDWELL (1934), BERKELEY (1935) 45 ° C und DELLE COSTE 46 bis 48 ° C als kritische Temperaturgrenze. In unseren eigenen Versuchen war der kritische Punkt bei 40 ° C zu suchen. Bezüglich der Verdünnungsfähigkeit sind uns nur die Angaben von MILBRATH (1 : 50), SMITH (1 : 10 000 bis 1 : 100 000) und von DELLE COSTE (1 : 100 bis 1 : 1000) bekannt geworden. Der letztgenannte Autor gibt auch noch folgende Zahlen anderer Untersucher an: BONNEMAISON erhielt keine Läsionen bei Verdünnungen über 1 : 1000, COSTA und FORSTER fanden als größte Verdünnung ohne Inaktivierung 1 : 5000. Diese Angaben variieren sehr stark und können wohl nicht allein damit erklärt werden, daß MILBRATH mit der als „tipblight" bekannten Variante gearbeitet hat, während SMITH seine Angaben auf die typische Form bezieht. Auch DELLE COSTE weist auf die hohen Werte hin, die SMITH angibt. Wahrscheinlich hängen die recht unterschiedlichen Werte nicht zuletzt mit der relativ sehr kurzen Alterungsgrenze zusammen, die ihrerseits wiederum von der Temperatur abzuhängen scheint. Bei 21 ° C liegt nach DELLE COSTE die Inaktivierungsgrenze zwischen 2 und 2½ Stunden, bei 25 ° C bei 1¼ Stunden. Wurde der frische Preßsaft auf 5 ° für die Dauer von 2½ Stunden abgekühlt, so ließ sich die Inaktivierung bis 24 Stunden aufschieben. In unseren eigenen Versuchen wurden die mit verdünnten Preßsäften abgeriebenen Pflanzen die beiden ersten Tage nach der Infektion zusätzlich belichtet (135 Watt — Belichtungszeit: 17 bis 23 und 7 bis 9 Uhr); mittels eines Ventilators wurde die Temperatur konstant zwischen 20 und 22 ° C gehalten. In der Verdünnungsstufe 1 : 128 wurde ein positives Ergebnis bei allen abgeriebenen Pflanzen erzielt, in den stärkeren Verdünnungen blieben die Pflanzen symptomfrei. Weiterhin charakteristisch ist die sehr geringe Lebensbeständigkeit in vitro, die auch in unseren Versuchen immer in Erscheinung trat, ohne daß wir allerdings ihre zeitliche Dauer genau festlegten. MILBRATH gibt für die Lebensbeständigkeit in vitro eine Zeitdauer von 1 Stunde an, SMITH eine solche von weniger als 5 Stunden, BALD und SAMUEL sprechen von 6 Stunden. Auch hier bezieht sich die Angabe von MILBRATH auf tipblight, während er in einer späteren Arbeit über den typischen Virusstamm 5 bis 6 Stunden benennt. Diese geringe Lebensbeständigkeit hat dazu geführt, daß man sich mit den Fragen der Inaktivierung bzw. der Infektionserhöhung gerade bei diesem Virus besonders intensiv beschäftigt hat. Eine schnelle Inaktivierung wird durch 0,001 mol oxydierende

Substanzen erzielt, deren Potential in Suspensionen von pH 7 größer als 0,2 Volt ist. Bei Filtration (45 min) durch Pasteur-Chamberland-Filter wird das Virus inaktiviert, ebenso liegen die Verhältnisse bei Filtration durch Gradocol-Membranen mit einem Porendurchmesser von 0,45 $\mu$. Die Lebensbeständigkeit der Virussuspensionen wird bei niedriger Temperatur durch Zusatz von reduzierenden Substanzen (z. B. Natriumsulfit) erhöht. Eine Infektionserhöhung tritt bei Zusatz von 20 ccm 0,1 %iger wäßriger Lösung von Sulphanilamid ein, die sich bei Pufferzusatz noch verstärkt, allerdings ist die stimulierende Wirkung bereits nach einer Stunde nicht mehr zu bemerken. Wasserstoff in Gegenwart von platiniertem Platin hemmt die normale aerobe Inaktivierung des Virus in Pufferlösung von pH 7, hier bleibt der Preßsaft 8 Stunden aktiv. Auch in Gegenwart von 0,01 mol Cystein, bei Abwesenheit von Sauerstoff, bleiben Virussuspensionen bei pH 7,5 für einen Zeitraum von 35 Tagen aktiv. Natriumsalze von Glutathion, Thioglycollsäure und Ascorbinsäure (0,01 mol) schützen das Virus gegen schnelle aerobe Inaktivierung bei pH 7. Adrenalin (0,01 mol) verhindert die aerobe Inaktivierung nicht, ist aber gegen eine Virulenzminderung wirksam, die sonst bei Sauerstoffmangel aufzutreten pflegt. KCN (0,01 mol) verhindert anaerobe und aerobe Inaktivierung, während Catechol und Phenol das Virus an der Luft inaktivieren, nicht aber bei Anwesenheit von Natriumsulfit.

Bei der Erörterung der Symptomatologie wurde bereits angedeutet, daß eine große Variation der Symptome möglich ist. Neben der modifizierenden Wirkung von Außenfaktoren, die innerhalb eines bestimmten Variationsbereiches wirksam werden können, ist es in erster Linie das Virus selbst, das hierfür verantwortlich zu machen ist. Ebenso, wie dies für eine ganze Anzahl anderer Virosen gilt, ist auch für das Virus der Bronzefleckenkrankheit bekannt, daß hier verschiedene Stämme vorliegen. Hier ist zunächst der tip-blight-Stamm zu nennen (= *Lethum australiense* var. *lethale* Holmes), der lange Zeit für eine eigene Krankheit gehalten wurde. Dieser Stamm ist dadurch charakterisiert, daß keine Bronzefärbung, sondern lediglich eine nekrotische Fleckenbildung und Stengelstreifung stattfindet. Die Nekrose wird bei der Tomate systemisch; der Terminaltrieb ist geschwärzt und die tote Spitze steht aufrecht über dem lebenden Blattwerk. Auch die Frucht weist in ihrem Innern Taschen von nekrotischem Gewebe auf oder es treten subepidermale Nekrosen auf, die äußerlich als konzentrisches braunes Band in Erscheinung treten. Auch bei einem in Großbritannien bekanntgewordenen Stamm unterbleibt die Bildung der Bronzeflecken, die Sprosse enden hier in Blütentrauben, die Fiederblätter sind aufgerollt und rötlich verfärbt. Das Vorkommen mehrerer Stämme wird auch dadurch unter Beweis gestellt, daß eine Sorte, die an einem Anbauort sich als widerstandsfähig erwiesen hat, bei Verbringen an einen anderen Ort befallen werden kann, was mit dem Vorhandensein eines anderen Stammes am eindeutigsten seine Erklärung findet.

Sehr groß ist der Wirtspflanzenbereich des Virus der Bronzefleckenkrankheit. So lag auch in unserem Fall von vornherein der Verdacht nahe, daß in der eingangs genannten Gärtnerei das Virus von anderen Pflanzen

auf die Tomate übergegangen war und mit Zierpflanzen eingeschleppt worden ist. Um für diese Vermutung nähere Anhaltspunkte zu gewinnen, wurden die sehr umfangreichen Anzucht- und Vermehrungsanlagen untersucht und alle virusverdächtigen Pflanzen entnommen, um sie einer näheren Untersuchung zu unterziehen. Als Testpflanze wurde *Nicotiana tabacum* (var. Samsun) verwendet.

Untersuchung anormal erscheinender Pflanzen auf Bronzefleckenvirusbefall

| Pflanzenart | Symptome der Pflanze | Symptome auf Tabak |
|---|---|---|
| *Fuchsia* | gestauchter Wuchs, verdrehte Blätter und Fleckenbildung | symptomlos |
| *Campanula* | gestauchter Wuchs, Blätter klein und gerollt | symptomlos |
| *Zantedeschia (Calla)* | helle nekrotische Flecke | typische konzentrische Flecke |
| *Salvia* | gestauchter Wuchs, Blätter gelbfleckig | symptomlos |
| *Dahlia* | gestauchter Wuchs, deformiert, Blattaufhellungen, verkürzte Internodien | symptomlos |
| *Chrysanthemum* | Blattaufhellungen | symptomlos |
| *Begonia* | gestauchter Wuchs, verkleinerte, aufgehellte Blätter | symptomlos |
| *Apium graveolens* | Blätter aufgehellt, Adern hervortretend | symptomlos |
| *Lathyrus odoratus* | gelbe, abgegrenzte Flecke, vereinzelt auftretend | symptomlos |
| *Primula sinensis* | gelbfleckig | symptomlos |
| *Aquilegia* | Blattaufhellungen | Symptome dem X-Virus entsprechend |
| *Callistephus (Aster)* | gestauchter Wuchs, kleine, verkümmerte, rotfleckige Blätter; Blüten vergrünt | symptomlos |
| *Verbena* | bronzefarbene Flecke, in Wuchs und Knospenbildung zurückgeblieben | symptomlos |
| *Cheiranthus* | gestauchter Wuchs, gelbfleckige Blätter, starke Wachstumshemmung | symptomlos |
| *Petunia* | Blätter klein und vergilbt, Knospen vergrünt | symptomlos |
| *Antirrhinum* | Blätter verdreht und deformiert, gestauchter Wuchs | symptomlos |
| *Zinnia elegans* | längs der Blattadern dunkelgrün | symptomlos |

Zur gleichen Zeit wurden auch von den beiden ursprünglich verseuchten Tomatenbeständen der Sorten Immun und Rheinlands Ruhm, die auf unsere Veranlassung von allen bronzefleckenkranken bzw. -verdächtigen Pflanzen bereinigt worden waren, nochmals von viruskranken Pflanzen, die aber sämtlich keine Bronzeflecke aufwiesen, Abreibungen gemacht. Die erkrankten Pflanzen zeigten ausnahmslos mosaikartige Blattaufhellungen. In allen Fällen ergab sich einwandfrei der Nachweis, daß die Tomatenpflanzen von Tabakmosaik befallen waren. Bei allen vorstehend geprüften virusverdächtigen Pflanzen ergaben sich lediglich bei Calla Symptome, die darauf schließen ließen, daß hier eine Infektion mit dem Virus der Bronzeflecken-

krankheit vorlag. In vielen anderen Fällen, z. B. bei der Dahlie, lagen sicherlich ebenfalls Virusinfektionen vor, die aber mit Hilfe einer Tabakabreibung nicht zu analysieren waren. Da uns nichts an einem generellen Virusnachweis gelegen war, so wurden diese Fälle nicht weiter verfolgt. Abreibungen von Preßsaft kranker Calla-Pflanzen auf Tomaten ließen schon nach einer Woche auf den Tomaten charakteristische Symptome sichtbar werden, die in allen Einzelheiten denen der Bronzefleckenkrankheit entsprachen. Es dürfte daher keinem Zweifel unterliegen, daß das Virus der Bronzefleckenkrankheit mit Calla in den Betrieb eingeschleppt worden ist und dann dort die Möglichkeit des Überganges auf Tomaten geboten war. Im darauffolgenden Jahr sind aus einer Gärtnerei in der Nähe von Magdeburg ebenfalls bronzefleckenkranke Tomaten bekanntgeworden, und wenn auch hier diese Frage nicht in gleicher Weise aufgegriffen worden ist, so dürfte es doch sehr wahrscheinlich sein, daß auch hier das Virus mit anderen Zierpflanzen in den Betrieb eingeschleppt worden ist. Man muß daher, um die weitere Ausbreitung bzw. Einbürgerung dieser Krankheit zu verhüten, zukünftig sein besonderes Augenmerk den Gärtnereien zuwenden, da sie als Ausgangspunkte einer weitergreifenden Verseuchung von besonderer Bedeutung sein können. Eine wesentliche Voraussetzung, um dieser Forderung gerecht werden zu können, bildet die genaue Kenntnis des Wirtspflanzenkreises. Da die meisten Angaben hierüber nur unvollständig sind und meist eine Ergänzung bereits an anderer Stelle veröffentlichter Feststellungen sind, haben wir auf Grund der uns zugänglich gewesenen Literatur den Wirtspflanzenkreis zusammengestellt und verweisen auf nachfolgende Übersicht.

Wirtspflanzenbereich des Virus der Bronzefleckenkrankheit in systematischer Anordnung

Monocotyledoneae

| Familie | Wirtspflanzen | Familie | Wirtspflanzen |
|---|---|---|---|
| Pandanaceae | *Pandanus* sp. | Bromeliaceae | *Ananas comosus (A. sativus)* |
| Araceae | *Arum* sp. | Liliaceae | *Agapanthus* sp. |
| | *Dieffenbachia* sp. | Amaryllidaceae | *Amaryllis* sp. |
| | *Zantedeschia (Richardia) aethiopica* | | *Hippeastrum* sp. |
| | | Orchidaceae | *Dendrobium* sp. |

Dicotyledoneae

| Familie | Wirtspflanzen | Familie | Wirtspflanzen |
|---|---|---|---|
| Urticaceae | *Urtica dioica* | Cruciferae | *Brassica oleracea* var. *botrytis* |
| Aristolochiaceae | *Aristolochia elegans* | | *Cheiranthus* sp. |
| Polygonaceae | *Polygonum convolvulus* | | *Matthiola incana* |
| Chenopodiaceae | *Spinacia oleracea* | Leguminosae | *Arachis hypogaea* |
| Amarantaceae | *Celosia* sp. | | *Cassia floribunda* |
| Caryophyllaceae | *Stellaria media* | | *Lathyrus odoratus* |
| Ranunculaceae | *Anemone* sp. | | *Lupinus* sp., *L. leucophyllus, L. polyphyllus* |
| | *Aquilegia* sp. | | *Phaseolus vulgaris* |
| | *Delphinium* sp. | | *Pisum* sp., *P. arvense, P. sativum* |
| | *Ranunculus* sp. | | *Medicago* sp. |
| | *Paeonia* sp. | | |
| Papaveraceae | *Papaver* sp., *P. nudicaule, P. somniferum* | | |

| Familie | Wirtspflanzen |
|---|---|
| Leguminosae | *Vicia* sp., *V. faba* |
| | *Vigna unguiculata (V. sinensis)* |
| Geraniaceae | *Pelargonium peltatum* |
| Tropaeolaceae | *Tropaeolum* sp., *T. majus* |
| Balsaminaceae | *Impatiens balsamina* |
| Malvaceae | *Malva* sp. |
| Violaceae | *Viola* sp. |
| Begoniaceae | *Begonia* sp. |
| Oenotheraceae | *Fuchsia* sp. |
| | *Godetia* sp. |
| Umbelliferae | *Apium graveolens* |
| Primulaceae | *Primula malacoides, P. obconica, P. sinensis* |
| Asclepiadaceae | *Hoya carnosa, Stapelia* sp. |
| Convolvulaceae | *Convolvulus arvensis* |
| Borraginaceae | *Anchusa capensis* |
| Verbenaceae | *Verbena* sp. |
| Labiatae | *Ocimum basilicum* |
| | *Salvia* sp. |
| Solanaceae | *Atropa belladonna* |
| | *Capsicum* sp., *C. annuum* |
| | *Cestrum parquii* |
| | *Browallia speciosa* var. *major* |
| | *Brunfelsia* sp. |
| | *Cyphomandra betacea* |
| | *Datura ferox, D. meteloides (D. wrightii)* |
| | *D. stramonium* |
| | *Hyoscyamus niger* |
| | *Lycium ferocissimum (L. campanulatum)* |
| | *Nicandra physaloides* |
| | *Nicotiana acuminata, N. alata, N. angustifolia, N. atropurpurea, N. bigelovii, N. calyciflora, N. caudigera, N. chinensis, N. glauca, N. glutinosa, N. langsdorffii, N. longiflora, N. macrophylla, N. paniculata, N. rustica, N. sanderae, N. silvestris, N. suaveolens, N. tabacum* |
| | *Petunia hybrida* |
| | *Physalis* sp., *P. franchetti, P. minima, P. peruviana* |
| | *Salpichroa origanifolia (S. rhomboidea)* |
| Solanaceae | *Salpiglossis* sp. |
| | *Schizanthus* sp. |
| | *Solanum aculeatissimum, S. capsicastrum, S. dulcamara, S. laciniatum, S. lycopersicum (Lycopersicum esculentum), S. marginatum, S. melongena, S. miniatum, S. nigrum, S. nodiflorum, S. pimpinellifolium (Lycopersicum pimpinellifolium), S. pocote, S. pseudocapsicum, S. sanitwongsii, S. seaforthianum, S. sodomaeum, S. tuberosum* |
| | *Streptosolen jamesonii* |
| Scrophulariaceae | *Pentastemon (Pentstemon)* sp. |
| | *Antirrhinum* sp., *A. majus* |
| | *Calceolaria* sp. |
| Martyniaceae | *Martynia* sp. |
| Gesneriaceae | *Sinningia (Gloxinia)* sp. |
| Plantaginaceae | *Plantago* sp. |
| Dipsacaceae | *Scabiosa* sp. |
| Campanulaceae | *Campanula* sp., *C. pyramidalis* |
| | *Trachelium caeruleum* |
| Compositae | *Bidens pilosus* |
| | *Calendula officinalis* |
| | *Callistephus chinensis* |
| | *Chrysanthemum* sp. |
| | *Cichorium endivia, C. intybus* |
| | *Coreopsis drummondii* |
| | *Cosmos* sp. |
| | *Dahlia variabilis* |
| | *Emilia* sp. |
| | *Erlangea tomentosa* |
| | *Gaillardia* sp. |
| | *Helianthus annuus* |
| | *Layia* sp. |
| | *Lactuca sativa* var. *capitata* |
| | *L. s.* var. *longifolia* |
| | *Senecio cruentus (Cineraria cruenta)* |
| | *Sonchus oleraceus* |
| | *Tagetes erecta* |
| | *Zinnia* sp., *Zinnia elegans* |

Es sei hier ausdrücklich darauf hingewiesen, daß sich die Angaben verschiedener Autoren bezüglich der Wirtspflanzen widersprechen. So wird die Kartoffel vielfach als widerstandsfähig bezeichnet, während gerade in der letzten Zeit zahlreiche Berichte darauf hindeuten, daß die Verluste auch im

Kartoffelbau wirtschaftlich wichtig sein können. Delle Coste gibt in seiner Arbeit auch eine Liste von Pflanzen, die er nicht hat infizieren können, die wir nachstehend wiedergeben. Pflanzen, die auch auf der Wirtspflanzenliste vorkommen, sind besonders gekennzeichnet.

### Nichtwirte

nach den Untersuchungen von Delle Coste
(Die auch bei den Wirtspflanzen aufgeführten sind mit einem + versehen)

Monocotyledoneae

| Familie | Wirtspflanze | Familie | Wirtspflanze |
|---|---|---|---|
| Liliaceae | *Allium cepa* | Amaryllidaceae | *Crinum* sp. |

Dicotyledoneae

| Familie | Wirtspflanzen | Familie | Wirtspflanzen |
|---|---|---|---|
| Polygonaceae | *Polygonum aviculare* | Oxalidaceae | *Oxalis rubra, O. cernua* |
| | + *Polygonum convolvulus* | Violaceae | + ? *Viola tricolor* |
| | *Rheum* sp. | Passifloraceae | *Passiflora* sp. |
| | *Rumex crispus* | | |
| Chenopodiaceae | *Beta vulgaris* | Begoniaceae | + ? *Begonia* sp. |
| Amarantaceae | *Amarantus crispus* | Umbelliferae | + *Apium graveolens* |
| | + *Celosia* sp. | | *Daucus carota* |
| Cruciferae | *Brassica nigra* | | *Petroselinum* sp. |
| | *Eruca sativa* | Cucurbitaceae | alle untersuchten Arten |
| | *Raphanus sativus* | | |
| Leguminosae | *Dolichos lablab* | Compositae | + *Calendula officinalis* |
| | *Glycine max (G. soja)* | | *Carduus nutans* |
| | + *Lathyrus odoratus* | | *Centaurea melitensis* |
| | + *Lupinus* sp. | | + *Chrysanthemum* sp. |
| | *Medicago lupulina* | | *Cynara scolymus* |
| | *Melilotus albus* | | *Helichrysum* sp. |
| | + *Pisum sativum* | | + *Lactuca sativa* |
| | + *Vicia faba* | | *Silybum marianum* |

Diese Widersprüche könnten in abweichenden Eigenschaften der verschiedenen Stämme begründet sein oder auch in den Sorten der Kulturgewächse, die zu den Infektionsversuchen benutzt wurden. Dann wäre es aber auch denkbar, daß die verschiedenen Übertragungsmethoden zu verschiedenen Ergebnissen führen, wie es der eine von uns (Uschdraweit) bei den Versuchen mit Gurkenmosaik bei Tomaten festgestellt hat. — Dabei scheint die Insektenübertragung im Freiland sehr viel wirksamer zu sein als die Übertragung durch Preßsaft. Auch spielen das Alter und die Konstitution der Wirtspflanzen bei der künstlichen und wohl auch bei der Freiland-Infektion eine erhebliche Rolle.

Wie es der Regel bei der Bekämpfung von Viruskrankheiten entspricht, kommt den vorbeugenden Maßnahmen die größte Bedeutung zu, da direkte Bekämpfungsmaßnahmen fehlen. So ist bei der Anzucht von Tomaten in Gewächshäusern darauf zu achten, daß im gleichen Raum keine infizierten

Zierpflanzen oder andere Wirte vorhanden sind, von denen das Virus dann durch Insekten übertragen werden kann. Auch der Unkrautbekämpfung in der Nähe von Gewächshäusern und Anzuchtbeeten ist entsprechende Beachtung zu schenken, da auch von diesen Infektionsreservoiren aus die Krankheit verbreitet werden kann. Endemische Infektionsreservoire sind besonders in Gebieten mit milden Wintern, wenig Sommerregen und ständig lebenden Wirten vorhanden. Im Zusammenhang mit allen vorbeugenden Maßnahmen ist auch der Bekämpfung der Insektenüberträger größte Beachtung zu schenken. So hat man z. B. durch Spritzungen in Anzuchtbeeten mit Brechweinstein (1 g + 2 g Zucker in 1 Liter) gewisse Erfolge erzielt, die aber nicht ausreichend sind, da noch 30 % der Pflanzen infiziert waren. Behandlungen mit 4 % Nikotinstaub (wöchentlich), 0,5 % HCC (14tägig) und 5 % DDT (3wöchentlich) ergaben eine Verdoppelung der Zahl der gesunden Pflanzen. In Argentinien erzielte man eine Reduktion der kranken Pflanzen von 70 % dadurch, daß man vom Auflaufen bis zum Zeitpunkt des Verpflanzens, in Abständen von 14 Tagen, mit 2 % DDT stäubte, um dann alle drei Wochen 2,5 % DDT zu stäuben. Nach Möglichkeit soll man allerdings DDT bei jungen Pflanzen vermeiden, da die Gefahr einer Pflanzenschädigung gegeben ist, und verwendet an seiner Stelle 4 % Nikotin. In Australien hat man versuchsweise Schutzimpfungen mit einem schwach virulenten Stamm des Bronzefleckenvirus durchgeführt, jedoch erwies sich die Wirkung nur von zeitlich begrenzter Dauer. Da in der Widerstandsfähigkeit der einzelnen Sorten deutliche Resistenzunterschiede gegeben sind, so kann man sich mit Erfolg der Möglichkeit des Anbaues resistenter Sorten bedienen. Die jeweiligen Angaben zeigen jedoch mit aller Deutlichkeit, daß von einer generellen Resistenz keine Rede sein kann, sondern daß jeweils nur eine Resistenz gegen einen bestimmten Stamm des Virus der Bronzefleckenkrankheit vorliegt. So erwies sich z. B. die Sorte Pearl Harbour in Hawaii als resistent, während sie in Australien und in U.S.A. keine erhöhte Widerstandsfähigkeit bewies. Bei einzelnen Linien der argentinischen Sorten Rey de los Tempranos und Manzana beruht die Widerstandsfähigkeit auf einem einfachen Mendelfaktor, während bei einem resistenten Stamm von *Lycopersicum pimpinellifolium* (= Porter's Stamm der Red Currant Tomate) kein einfach mendelnder Faktor, sondern ein rezessiv vererbtes Merkmal vorliegt. Auch die Deutsche Zuckertomate wird als mäßig widerstandsfähig genannt.

## Literaturverzeichnis

1. AINSWORTH, G. C., 1933. Virus disease investigations. (a) Spotted wilt of tomatoes. (b) Mosaic and „stripe" disease of tomatoes.
Eighteenth ann. rep. Cheshunt exp. res. stat. 1932, 39—45.
2. BENNET, C. W., 1944. Studies of dodder transmission of plant viruses.
Phytopathology **34**, 905—932.
3. BEST, R. J., 1937. On the presence of an „oxidase" in the juice expressed from tomato plants infected with the virus of tomato spotted wilt.
Austral. journ. exp. biol. **15**, 191—199.
4. — —, 1939. The presentative effect of some reducing systems on the virus of tomato spotted wilt.
Austral. journ. exp. biol. **17**, 1—17.

5. Best, R. J., 1946. Inactivation of tomato spotted wilt virus by salycilate. Austral. journ. exp. biol. **24**, 26—31.
6. Brittlebank, C. C., 1919. A new tomato disease „spotted wilt". Journ. agric. Victoria **27**, 231—235.
7. Conroy, R. J., Shirlov, N. S., Wilson, R. D. und Warding, E. J., 1949. Tuber transmission of the spotted wilt disease of potatoes. Agric. gaz. New South Wales **60**, 101—103.
8. Costa, A. S., 1944. Observacoes sobre vira-cabaca em tomateiros. Bragantia **4**, 489—507.
9. Delle Coste, A. C. und Zabala, S., 1936. La peste negra del tomato o „corcovo" del tabaco en la Republica Argentina. Publ. misc. minist. agric. Buenos Aires Ser. A **2**, 17.
10. Dufrénoy, J., 1937. Le „spotted wilt". Ann. épiphyt., n. s. **3**, 187—223.
11. Eristavi, E. M., 1941. Virus diseases of plants in Georgian SSR. in „Plant virus diseases and their control". Transact. conf. plant virus diseases, Moskau, s. 294.
12. Gardner, M. W., Tompkins, C. M. und Thomas, H. R., 1937. Factors affecting the prevalence of the spotted wilt virus. Phytopathology **27**, 129.
13. Grieve, B. J., 1943. Studies in the physiology of hostparasite-relations. 4. Some effects of tomato spotted wilt on growth. Austral. journ. exp. biol. **21**, 89—101.
14. Holmes, F. O., 1948. The filterable viruses. Baltimore, S. 1223—1224.
15. — —, 1948. A new type of resistance to spotted wilt. Phytopathology **38**, 13—14.
16. — —, 1948. Resistance to spotted wilt in tomato. Phytopathology **38**, 467—473.
17. Hutton, E. M., 1949. Increasing the infectivity of the spotted wilt virus. Journ. Austral. inst. agric. sci. **15**, 43—44.
18. — — und Peak, A. R., 1949. Spotted wilt resistance in the tomato. Journ. Austral. inst. agric. sci. **15**, 32—36.
19. McWhorter, F. P. und Milbrath, J. A., 1938. The tipblight disease of tomato. Oregon agric. exp. stat. Stat. Circ. 128.
20. Norris, D. O., 1943. Strains of spotted wilt virus and the identity of tomato tipblight virus with spotted wilt. Journ. council sci. industr. res. Australia **16**, 91—92.
21. — — und Bald, J. G., 1943. Transmission of spotted wilt through potato tubers. Journ. Austral. inst. agric. sci. **9**, 34—35.
22. Ogilvie, L., 1934. Spotted wilt of tomatoes and its control. Ann. rep. agric. horticult. res. stat. Long Ashton 170—174.
23. Porter, D. R. und Smith, P. G., 1944. Reaction of Lycopersicon spp. to spotted wilt. Phytopathology **34**, 461—462.
24. Sakimura, K., 1940. Evidence for the identity of the yellow spot virus with the spotted wilt virus: Experiments with the vector *Thrips tabaci*. Phytopathology **30**, 281—299.
25. Smith, K. M., 1933. Spotted wilt: an important virus disease of the tomato. Journ. min. agric. **39**, 1097—1103.
26. — —, 1935. Some diseases of ornamental plants by the virus of tomato spotted wilt. Journ. roy. horticult. soc. **60**, 305.
27. — —, 1937. A textbook of plant virus diseases. London, S. 296—315.
28. Smith, P. G. u. Gardner, M. W., 1951. Resistance in tomato to the spotted wilt virus. Phytopathology **41**, 257—260.
29. Uschdraweit, H. A., 1951. Viruskrankheiten der Tomaten. Phytopatholog. Ztschr. **18**, 231—245.

*Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusforschung, Celle*

# Die Bukettkrankheit, eine Viruskrankheit der Kartoffel

Von

E. Köhler

*Mit 16 Abbildungen*

In Niedersachsen wird seit Kriegsende eine Viruskrankheit an Kartoffeln beobachtet, die die befallenen Stauden in der Regel schwer schädigt und den Knollenertrag herabsetzt. Ihre Verbreitung beschränkt sich zwar auf engbegrenzte Bezirke; es bedarf jedoch augenscheinlich besonderer Aufmerksamkeit, um die Krankheit wieder auszurotten oder zumindest auf ihren Herd zu beschränken. Übertragungsversuche mit dem Saft typisch erkrankter eingesandter Pflanzen lieferten am türkischen Tabak ausnahmslos ähnliche Befallssymptome, wie sie für das Tabak-ringspot-Virus charakteristisch und seit langem beschrieben sind (Wingard, 1928; Henderson und Wingard, 1931). Auch andere Merkmale lassen die Zugehörigkeit des verursachenden Virus zu der ring spot-Gruppe (im weiteren Sinne*) eindeutig erkennen. Mit Rücksicht auf das eigenartige Krankheitsbild, das die befallene Kartoffelstaude bietet, wird die Krankheit neuerdings als Bukettkrankheit bezeichnet. Schon früher (Schander, 1925) war diese Bezeichnung für einen ähnlichen, ätiologisch damals ungeklärten Krankheitstyp verwendet worden. Diese Krankheit ist später anscheinend von selbst wieder verschwunden. Ob sie mit der hier gemeinten Bukettkrankheit in Beziehung steht, läßt sich nicht mehr feststellen, ist aber nicht unwahrscheinlich. Kurze Mitteilungen über die neue Krankheit wurden von Köhler (1950) und Körner (1950) bereits veröffentlicht.

Zunächst seien die Krankheitserscheinungen auf dem Feld beschrieben. Hier sind bemerkenswerte Modifikationen möglich. Als Norm kann man vielleicht das folgende Verhalten ansehen: Die aus infizierten Knollen hervorgegangenen kranken Kartoffelstauden fallen durch ihren Kümmerwuchs und die zugleich büschelförmige, gedrungene Laub-

*) Dazu rechnen wir allerdings nicht das in der nordamerikanischen Literatur oft als potato-ring spot bezeichnete X-Virus. Seine Einbeziehung durch Holmes (1948) in das von ihm aufgestellte Genus *Annulus* halten wir für wenig glücklich.

Abb. 1 Bukettkranke Stauden zwischen gesunden im Feldbestand
*(Photo: Dr. Körner)*

entwicklung in die Augen (Abb. 1 u. 2). Verhältnismäßig häufig kommt es vor, daß nur ein Teil der Sprosse einer Staude krank ist, während die übrigen völlig normal entwickelt sein können (Abb. 2 u. 3); nicht selten ist überhaupt nur ein einziger Stengel krank. Ein Zweifel darüber, welche Stauden bzw. einzelne Sprosse als krank und welche als gesund anzusehen sind, scheint ausgeschlossen. Befinden sich relativ wenige kranke Stauden im Bestand, so sind diese nur in der Anfangsentwicklung deutlich wahrzunehmen. Später werden die schwer kümmernden Stauden und Sprosse von den gesunden leicht völlig überdeckt, so daß der Bestand einen ganz gesunden Eindruck macht.

Abweichend von diesem Verhalten beobachtet man auch, daß die kranken Stengel nicht alle denselben starken Kümmerwuchs aufweisen, sondern man

Abb. 2. Gruppe von bukettkranken Stauden im Feldbestand. Vorne rechts eine Staude mit zwei gesunden Laubtrieben neben mehreren kranken
*(Photo: Dr. Körner)*

Abb. 3. Eine Staude mit gesunden und kranken Sprossen *(Photo: Dr. Körner)*

findet neben stark-kranken Stauden bzw. Stengeln auch solche mit schwächer ausgeprägtem Symptombild, wobei die Stengel die normale Größe erreichen können und nur ihre Wipfelblätter schwache Kräuselerscheinungen zeigen. Endlich können auf einem Feld alle Übergänge zwischen stärkstem Kräusel- und Kümmerwuchs bis zu völlig normaler Ausbildung vorhanden sein, so daß es schwierig ist, die gesunden und schwach-kranken Stauden sicher voneinander zu trennen. Die Krankheit neigt also unter Umständen zur Maskierung. Daß es sich um Maskierung handelt, ergibt sich aus der Tatsache, daß von verschiedenen Feldern, die mit Pflanzgut aus ein und derselben Lieferung bestellt wurden, das eine Feld eine absolut klare, einheitliche, das andere die geschilderte uneinheitliche Krankheitsausprägung an den Tag legen konnte. Bei der Maskierung scheinen besonders Bodeneinflüsse maßgebend zu sein.

Betrachtet man die typisch bukettkranken Stengel näher, so findet man, daß bei einem Teil ihrer Blätter die Rhachis stark verkürzt ist, so daß die

Abb. 4. Bukettkranker Kartoffelsproß *(Photo: Dr. Körner)*

Abb. 5. Bukettkranke Kartoffelsprosse und -blätter *(Photo: Dr. Körner)*

Blattfiedern einander stark genähert sind. Obwohl diese beiderseits der Mittelrippe noch aufgefaltet oder aufgerollt sind, berühren sie sich seitlich (Abb. 4 und 5). Zu dieser Stauchung kommt noch, daß die Fiedern scharf abwärts gekrümmt sein können, so daß dann das ganze Blatt einen eigenartig wirteligen Anblick bietet. Die Blätter der Sproßspitze zeigen die Stauchung weniger, jedoch macht sich bei ihnen eine sichelförmige Abwärtskrümmung der Spitzen oft besonders auffällig bemerkbar. Die Blätter zeigen keinerlei mosaikartige Fleckung, wie überhaupt die kranke Staude im ganzen keine Farbabweichung erkennen läßt; jedoch finden sich auf den Blattunterseiten, namentlich auf den Hauptrippen, schwärzliche Strichelnekrosen, die später eine Art Wundschorf bilden können (Abb. 6).

Abb. 6. Krankes Blatt von der Unterseite mit schwarzem Wundschorf auf der Rhachis
*(Photo: Ver. Saatzuchten, Ebstorf)*

Abb. 7. Tabakblatt mit gezonten Ringflecken

Die im folgenden zu schildernden Übertragungsversuche wurden mit zwei Stämmen N und C ausgeführt. Der Stamm N wurde von einer typisch kranken Feldpflanze der Sorte Bona, der Stamm C von einem äußerlich gesunden, im Gewächshaus angezogenen „Augensteckling" der Sorte Condor durch Saftübertragung zum Samsun-Tabak isoliert.

Infiziert man junge Pflanzen des türkischen Tabaks, so bilden sich auf den Zuwachsblättern zuerst auffällig gezonte, meist sehr breite, hellgrüne Ring- und Kurvenmuster aus (Abb. 7). Stellenweise sind die hellen Zonen nekrotisch und erscheinen dann weißlich (Abb. 8). Unter dem Einfluß der Ringbildung zeigen die Blätter mehr oder weniger auffällige Verbeulungen (Abb. 9). Am White Burley-Tabak sind die Zeichnungsmuster kleiner und weniger

Abb. 8. Tabakblatt mit zum Teil nekrotischen Ringen

auffällig, aber im Prinzip dieselben. Am späteren Zuwachs verschwinden die Symptome gänzlich, und die Pflanzen entwickeln sich weiterhin äußerlich gesund, obwohl sie das Virus enthalten. Das Bukett-Virus zeigt also den typischen Krankheitsverlauf eines ring spot-Virus, d. h. das als erworbene Toleranz (oder auch erworbene Immunität) gekennzeichnete Verhalten.

Auch auf die Blätter von *Gomphrena globosa* (Amarantaceae) ist das Virus übertragbar. Auf den eingeriebenen Blättern bilden sich, ähnlich wie beim Kartoffel-X-Virus, kreisförmige Einzelherde, oft mit rötlichem Rand, die sich von denen des X-Virus vor allem durch die auffällige Breite der ringförmigen Nekrosen und durch ihre schnellere Ausbreitung unterscheiden (Abb. 10).

Eine besonders schwere Erkrankung zeigen die wachsenden Tomatenpflanzen. Wenige Tage nach der Infektion an den unteren Blättern machen sich an den Spitzenblättern schwere Absterbeerscheinungen bemerkbar (Abb. 11), so daß man den Eintritt einer Akronekrose (Absterben der Triebspitze) befürchtet. An den Achsenorganen treten dunkle Längsverfärbungen auf. Im weiteren Verlauf wächst die Spitze als „gesunder" Sproß ohne Nekrosenbildung weiter, und die geschädigten Blätter sterben ab (Abb. 12 a u. b). Bei dem stärkeren Stamm C entwickeln sich zunächst fadenförmige Blätter mit Anhängseln, den stark reduzierten Blattfiedern; sie sterben bald ab. Es folgen dann weniger deformierte Blätter, ebenfalls noch mit reduzierter Spreite, und erst auf sie kommen Blätter, die wieder ein normales Aussehen zeigen (Abb. 13). Die akute Schädigung und ihre schließliche Überwindung präsentiert sich also bei der Tomate noch weit eindringlicher als beim Tabak.

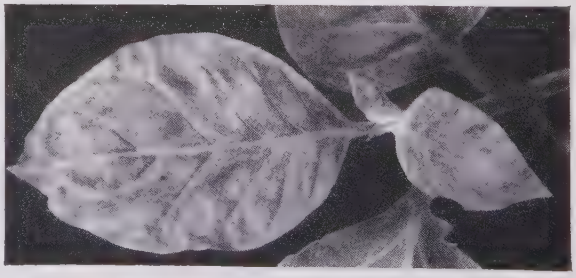


Abb. 9. Spitze einer jungen Tabakpflanze mit verbeulten Blättern

Sehr schwer wird auch *Phaseolus vulgaris* geschädigt (Abb. 14). Ob hier gleichfalls eine „Gesundung" auf die akute Schädigung folgt, wurde nicht untersucht.

Junge Gurkenpflanzen *(Cucumis sativa)*: Auf den eingeriebenen Keimblättern sind die Infektionsflecke als schwache rundliche Chlorosen kenntlich, auf den eingeriebenen Folgeblättern erscheinen kräftige chlorotische Flecken. In der Entfaltung begriffene Spitzenblätter zeigen unter dem Einfluß des Virus eine eigentümliche Entfaltungshemmung; die Spitzen und Ränder sind scharf nach unten gebogen, so daß eine Klauenform entsteht (Abb. 15).

Abb. 10. Blätter von *Gomphrena globosa* mit Ringnekrosen, acht Tage nach dem Einreiben

An *Calendula* treten auf den wachsenden Blättern als systemisches Symptom viele kleine weißliche Ringflecken in Erscheinung.

Abb. 11. Junge Tomatenpflanze mit schweren Absterbeschäden an den Spitzenblättern und Strichelnekrosen an den Achsenorganen

An *Solanum demissum* und dem *demissum*-Bastard A 6 zeigten sich keine Symptome.

Bei *Nicotiana glutinosa* traten an den eingeriebenen Blättern vereinzelte, zart nekrotische Ringe auf. An den oberen Blättern wurden die Symptome undeutlicher. Daß diese das Virus enthielten, zeigte die Testung mit den Blattsäften an Gomphrena.

Die beiden Stämme C und N wurden vergleichsweise auf junge Pflanzen verschiedener anderer Solanaceen verimpft, dabei wurden folgende Beobachtungen gemacht:

*Solanum polycanthos.* Bei C erschienen auf den eingeriebenen Blättern nekrotische

Abb. 12 a. Kranke Tomatenpflanze mit gesunder Spitzenentwicklung. Am unteren Teil die abgestorbenen Blätter herabhängend

Abb. 12 b. Vergrößerter Ausschnitt von Abb. 12 a. Unten die abgestorbenen verwelkten Blätter, weiter oben weniger geschädigte, aber noch stark deformierte Blätter

Einzelherde; Blattadern und Blattstiele wurden nekrotisch, was das Abfallen der Blätter zur Folge hatte. Bei N waren die nekrotischen Flecke kleiner, und die Blätter fielen nicht ab.

*Solanum luteum.* Bei C nekrotische Einzelherde mit Abfallen der Blätter, keine typischen Ringflecken. Bei N einige Blätter mit wenig deutlichen Symptomen, nicht abfallend; am jüngeren Zuwachs deutliche Ringflecken, diese, ähnlich wie beim Tabak, nicht nekrotisch.

*Datura gigantea.* Bei N keine sicheren Symptome. Bei C unklare Symptome, an solche des X-Virus am Tabak erinnernd.

*Nicandra physaloides.* Bei beiden Stämmen unklare nekrotische Erscheinungen an den Blättern.

Auch in den vorstehenden Versuchen erwies sich demnach wie bei der Tomate der C-Stamm meist deutlich stärker als der N-Stamm.

Am Samsun-Tabak vorgenommene reziproke Prämunitätsteste mit den beiden Stämmen C und N fielen positiv aus, wodurch bewiesen wird, daß sie

Abb. 13. Tomatenpflanze mit fadenförmigen Blättern im Mittelteil, oben allmählich wieder normale Blätter bildend

Abb. 14. *Phaseolus vulgaris* mit schwer geschädigten Blättern der Sproßspitze

beide als Varianten derselben Virusart aufzufassen sind. Durch den serologischen Test wurde dieses Ergebnis bestätigt*).

Die direkte Übertragung des Virus (Stamm N) zur Kartoffel mit dem Saft infizierter Tomaten-, Tabak- oder Kartoffelpflanzen durch Blatteinreibung ist bisher in keinem Fall gelungen, dagegen hatte Pfropfung von Sproßspitzen verschiedener Kartoffelsorten auf kranke Tabak- und Tomatenpflanzen Erfolg. Bei Tabak als Unterlage (Pfropfungen vom 30. August) erschienen bei den Sorten Monika und Urtica auf den Zuwachsblättern breite, meist vom Rand ausgehende braune, z. T. ringförmige Ne-

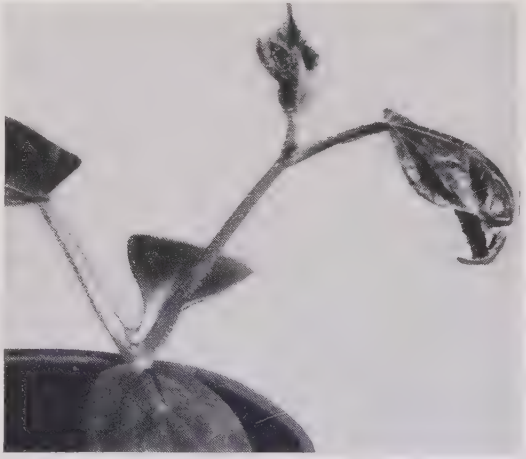


Abb. 15. Gurkenpflanze mit klauenförmigem Blatt (starke Epinastie)

*) Herrn Dr. Bercks (Braunschweig) danke ich für die Ausführung der serologischen Prüfung.

krosen, die mit Blattverbeulungen verbunden waren. Bei Tomaten als Unterlage (Pfropfungen vom 31. Oktober) waren die Fiedern der Zuwachsblätter der Kartoffelreiser (Sorte Ackersegen) teilweise in der Entfaltung gehemmt, entwickelten sich unsymmetrisch (Abb. 16) und blieben kleiner; z. T. war auch die Blattrhachis verkürzt, so daß die Endfieder unter das letzte Fiederpaar gleichsam hinunterkroch. Rückübertragungen von den erkrankten Blättern zum Tabak waren bei beiderlei Pfropfungen eindeutig positiv.

Abb. 16. Asymmetrische Blätter von auf kranke Tomate gepfropftem Kartoffelsproß

Bestimmung der Grenztemperatur der Inaktivierung (Stamm N). Zur Bestimmung diente der grob gereinigte Rohsaft aus kranken Tabakblättern (Samsun).

Bei 10 Minuten Erhitzungsdauer wurde die Grenztemperatur als zwischen 60 und 65 ° liegend ermittelt, wie nachstehende Ergebnisse zeigen.

a) Verimpfung zu *Gomphrena globosa* (je 6 Blätter auf angefeuchtetem Filtrierpapier in Deckelschalen).

55 ° Alle Blätter mit zahlreichen Infektionsherden,
60 ° alle Blätter mit Herden unterschiedlicher Zahl,
65 ° kein Blatt mit Herden.

b)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. Tabak | 55 ° | 8/8 | 2. Tomaten | 55 ° | 10/10 |
| | 60 ° | 10/10 | | 60 ° | 8/9 |
| | 65 ° | 0/10 | | 65 ° | 0/10 |

Demnach muß die Grenztemperatur näher bei 65 als bei 60 ° angenommen werden. Gomphrena erwies sich zu dem Versuch nicht weniger geeignet als Tabak und Tomate.

Mehrfach ist in der Literatur berichtet, daß bei ring spot-Viren Samenübertragung beobachtet wurde. Die wichtige Frage konnte beim Bukettvirus (Stamm N) nur in einem kleineren Versuch geprüft werden, der nachstehend beschrieben wird. Am 14. September wurden drei Tabakpflanzen von etwa 35 cm Höhe an je vier oberen Blättern mit Stamm N durch Einreiben beimpft. Nur bei Pflanze Nr. 3 zeigten sich im weiteren Wachstum an der Spitze ring spot-Symptome, nicht jedoch bei den Pflanzen Nr. 1 und 2. Durch am 10. November vorgenommene Übertragungsversuche mit dem Saft aus symptomlosen Spitzenblättern von Nr. 1 und 2 zu je zwei jungen Tabakpflanzen ließ sich eindeutig nachweisen, daß das Virus auch in ihnen enthalten war: alle vier Testpflanzen erkrankten typisch. Die drei schließlich etwa 1 m hohen Versuchspflanzen blühten und fruchteten normal. Im folgenden Früh-

jahr wurden die Samen der drei Pflanzen getrennt ausgesät. Symptome an den Sämlingen waren nicht vorhanden. Da mit Maskierung zu rechnen ist, wurde aus je drei Sämlingen gemeinsam der Saft ausgepreßt und von jeder der drei Nachkommenschaften 20 solche Sammelsäfte, insgesamt also Säfte von 180 Sämlingen, auf Testpflanzen verimpft. In keinem Fall wurde eine Infektion beobachtet. Samenübertragung konnte demnach nicht nachgewiesen werden.

## Erörterung

Es fragt sich, zu welchem von den verschiedenen bereits beschriebenen ring spot-Typen unser Bukett-Virus zu stellen ist. Auf der folgenden Tabelle sind die bisherigen Ergebnisse der Inaktivierungsversuche mit verschiedenen ring spot-Formen aufgeführt.

| | |
|---|---|
| 1. Tabak-ring spot (*Annulus tabaci* Holmes) | bei 68 ° (zit. Holmes, 1948) |
| 2. Kartoffel-ring spot („Bukett") | zwischen 60 u. 65 ° |
| 3. Kartoffel-ring spot (Gelbfleckigkeit) | zwischen 60 u. 64 ° (Köhler, 1940) |
| 4. Tomaten-ring spot (*A. zonatus* Holmes) | bei 55 bis 60 ° (zit. Holmes, 1948) |
| 5. Tomaten-ring spot | zwischen 56 u. 58 ° (Samson und Imle, 1942) |
| 6. Broad ring spot (*A. apertus* Holmes) | bei 54 ° (Johnson u. Fulton, 1942) |

Es ist ersichtlich, daß das vorliegende Bukett-Virus mit den von mir früher von gelbfleckigem Kartoffellaub isolierten Stämmen (3.) die meiste Übereinstimmung aufweist. Sowohl von den unter 4. und 5. aufgeführten, untereinander übereinstimmenden Tomaten-Viren wie von dem eigentlichen Tabak-ring spot-Virus (1.) weicht es stärker ab. Es sei noch bemerkt, daß die Viren 1 und 4 serologisch verschieden reagieren und deshalb als verschiedene Virusarten angesehen werden. Eine endgültige Klärung der Typenzugehörigkeit des Bukett-Virus wäre nur durch den Prämunitäts- und Serumtest zu gewinnen.

Da das Bukett-Virus zuerst mehrfach und gleich in hoher Frequenz in der Nähe von Tabakparzellen in Erscheinung trat, ist es wahrscheinlich, daß der Tabak der Ausgangspunkt der Kartoffelinfektionen war. Die Beziehungen zum Tabak lassen sich vielleicht durch die Annahme erklären, daß das Bukett-Virus auf dem Tabak durch Mutation aus dem harmlosen Kartoffelring spot (3.) hervorging; Passagen durch andere Wirtsarten haben sich bei Viren des öfteren schon als mutationsfördernd erwiesen.

Insektenübertragung ist bei den ring spot-Viren nach verschiedenen Beobachtungen anzunehmen (u. a. Köhler, 1940), jedoch ist ihr direkter Nachweis noch bei keinem ring spot-Virus gelungen[1]). Alle Übertragungsversuche

[1]) Anmerkung während der Korrektur: Nach Walters (Science 1951, **113**, 36) ist Übertragung durch die Feldheuschrecke *Melanoplus differentialis* in Nordamerika nachgewiesen.

mit Blattläusen waren bisher erfolglos, und auch die Erfahrungen mit dem vorliegenden Virus sprechen gegen die Annahme der Blattlausübertragung. Blasenfüße *(Thrips)* wurden verschiedentlich schon in Betracht gezogen, jedoch erhielten Samson und Imle (1942) in Übertragungsversuchen bei ihrem Tomaten-Virus keine Infektionen. Ebenso negativ fielen bisher Thrips-Übertragungsversuche mit dem Bukett-Virus aus (Völk, unveröffentlicht).

## Zusammenfassung

Unter dem Namen Bukett-Krankheit wird eine Viruskrankheit der Kartoffel beschrieben. Der Virus-Erreger gehört nach dem am Tabak entwickelten Symptombild zur Gruppe der ring spot-Viren. Die Grenztemperatur der Inaktivierung (bei 10 Minuten) liegt zwischen 60 und 65 °, also im gleichen Bereich wie bei den früher untersuchten, von Kartoffeln isolierten ring spot-Stämmen, die lediglich eine Gelbfleckigkeit am Kartoffellaub verursachen. Die Übereinstimmung bezüglich der Inaktivierungsgrenze legt die Annahme nahe, daß das Bukett-Virus eine stärkere Form dieses Gelbfleckigkeits-Virus vorstellt. Das Bukett-Virus wurde in einer stärkeren und einer schwächeren Variante angetroffen. Als Imperfekten-Bezeichnung wird für das Bukett-Virus hiermit der Ausdruck *Solanum-virus deformans* vorgeschlagen.

## Literaturverzeichnis

1. Henderson, R. G. und Wingard, S. A., 1931. Further studies on tobacco ring spot in Virginia. Journ. Agr. Res. **43**, 191.
2. Holmes, F. O., 1948. The filtrable viruses. Suppl. 2, Bergey's Manual Determin. Bacteriology, Edit. VI. Baltimore.
3. Johnson, J. und Fulton, R. W., 1942. The broad ringspot-virus. Phytopath. **32**, 605.
4. Köhler, E., 1940. Das Tabak-Ringspot-Virus als Erreger einer Gelbfleckigkeit des Kartoffellaubes. Angew. Bot. **22**, 385.
5. — —, 1950. Über das Vorkommen des Tabak-Ringfleckenvirus bei Kartoffeln. Nachr. blatt Dtsch. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig) **2**, 146.
6. Körner, Ergänzende Bemerkungen, ebenda, 147.
7. Price, W. C., 1940. Comparative host ranges of six plant viruses. Amer. Journ. Botany. **27**, 530.
8. Samson, R. W. und Imle, E. P., 1942. A ring spot of virus disease of tomato. Phytopath. **32**, 1037.
9. Schander, 1925. Die wichtigsten Kartoffelkrankheiten und ihre Bekämpfung. Kartoffelbauges. e. V., Berlin. 4. Aufl.
10. Wingard, S. A., 1928: Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. Journ. Agr. Res. **37**, 127.

*Aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Institut für Virusforschung, Celle*

# Beiträge zur Kenntnis des A-Virus der Kartoffel

Von

E. Köhler

*Mit 2 Abbildungen*

Die folgenden Ausführungen bilden die Fortsetzung von früheren Mitteilungen des Verfassers über das A-Virus (Köhler 1936, 1937, 1948; Köhler und Paukšens 1944).

## I. *Solanum demissum* als überempfindliche Wirtspflanze des A-Virus

Wenn man *Solanum demissum*-Blätter mit dem A-Virus einreibt, die entstandenen nekrotischen Einzelherde (Abb. 1 und 2) mit dem sie umgebenden unversehrten Randgewebe ausschneidet, in wenig Wasser zerdrückt und den gewonnenen Saft unter Verwendung von Karborundpuder auf andere Blätter von *Solanum demissum* verimpft, so erhält man nur ausnahmsweise einmal eine Infektion, obwohl man annehmen muß, daß die fortwachsenden Ränder der Infektionsflecken aktives Virus enthalten. Dieselbe Erfahrung macht man bei der Verimpfung von Säften ganzer Blattfiedern, die sehr viele solcher Infektionsflecken tragen. Die Infektionsanfälligkeit der *Solanum demissum*-Blätter ist offenbar zu gering, um auf die niedrige Virus-Konzentration der Impfsäfte anzusprechen. Bei den ähnlichen Infektionsherden, die vom Tabakmosaikvirus auf den Blättern von *Nicotiana glutinosa* hervorgerufen werden, hat man mit ebensolchen Verimpfungen fast immer Erfolg, vorausgesetzt, daß das Wachstum dieser Herde noch nicht zum Stillstand gekommen ist und ihre Ränder somit noch aktives Virus enthalten (Köhler 1947); bei diesem Objekt sind die Infektionschancen weit günstiger. Die Annahme, daß der Saft

Abb. 1. Blattfieder von *Solanum demissum* mit den nekrotischen Primärherden des A-Virus

Abb. 2. Wie bei Abb. 1; fortgeschritteneres Stadium mit von Infektionsherden ausgehenden „Nervenstricheln"

der *demissum*-Blätter eine infektionshemmende Wirkung ausübe, wurde geprüft und trifft nicht zu.

Etwas besser gelingt die Rückimpfung mit Säften aus Teilen von *demissum*-Sprossen, die man auf A-infizierte Kartoffeltriebe pfropft, wie nachstehender Versuch zeigt.

Als Pfropfunterlage wurde die Sorte Allerfrüheste Gelbe verwendet, die ein Träger des A-Virus ist. Sobald sich das Einströmen des Virus in die Blätter der *demissum*-Reiser durch kräftige Nekrosenbildung an ihnen bemerkbar machte, was nach 14 Tagen der Fall war, wurden die erkrankten Blätter gemeinsam ausgepreßt und der Sammelsaft mit Karborund auf Blätter von *Solanum demissum* verimpft („Serie A"). Ebenso wurden Stengel und Blattstiele der Reiser, denen die Blätter entnommen worden waren, ausgepreßt und als Sammelsaft gleichfalls verimpft („Serie B"). Am Tage darauf wurden auch Säfte aus Blättern der Kartoffelunterlagen zum Vergleich mit Serie B verimpft („Serie C"). Die Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 3 niedergelegt.

*Tabelle 1*

Serie A. Der Blatt-Sammelsaft wurde auf je drei Blätter von zwölf Testpflanzen verimpft

Anzahl Einzelherde

| Pflanze Nr. | Blatt Nr. 1 | Blatt Nr. 2 | Blatt Nr. 3 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|
| 1 | — | 1 | — | 1 |
| 2 | — | 1 | — | 1 |
| 3 | — | — | — | — |
| 4 | — | — | — | — |
| 5 | — | 2 | — | 2 |
| 6 | — | — | — | — |
| 7 | — | — | — | — |
| 8 | — | — | — | — |
| 9 | — | — | — | — |
| 10 | — | — | — | — |
| 11 | 1 | — | — | 1 |
| 12 | — | — | — | — |
| | | | | 5 |

Ergebnis: Auf 36 Blättern erschienen insgesamt 5 Herde.

*Tabelle 2*

Serie B. Sammelsaft aus Stengeln und Blattstielen

Anzahl Einzelherde

| Pflanze Nr. | Blatt Nr. 1 | Blatt Nr. 2 | Blatt Nr. 3 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|
| 1 | — | — | — | — |
| 2 | 2 | 2 | — | 4 |
| 3 | 1 | 2 | — | 3 |
| 4 | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | — |
| 6 | — | 1 | 1 | 2 |
| 7 | — | 1 | — | 1 |
| 8 | — | — | — | — |
| 9 | 1 | 2 | 1 | 4 |
| 10 | 2 | — | — | 2 |
| | | | | 16 |

Ergebnis: Auf 30 Blättern erschienen insgesamt 16 Herde.

*Tabelle 3*

Serie C. Abimpfungen mit Blattsäften der Pfropfunterlagen („Allerfrüheste Gelbe")

(Von jeder Unterlage wurden die Blattsammelsäfte auf zwei *demissum*-Pflanzen verimpft)

Anzahl Einzelherde

| Unterlage Nr. | Testpflanze Nr. | Blatt Nr. 1 | Blatt Nr. 2 | Blatt Nr. 3 | Gesamt | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1 | 4 | 1 | 0 | 5 | 12 |
| | 2 | 5 | 1 | 0 | 7 | |
| 2 | 1 | 4 | 3 | 4 | 11 | 32 |
| | 2 | 7 | 7 | 7 | 21 | |
| 4 | 1 | 19 | 23 | 23 | 65 | 111 |
| | 2 | 18 | 12 | 16 | 46 | |
| 5 | 1 | 4 | 9 | 11 | 24 | 44 |
| | 2 | 9 | 7 | 4 | 20 | |
| 7 | 1 | 0 | 3 | 2 | 5 | 6 |
| | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 | |

Ergebnis: Es fallen vor allem die sehr beträchtlichen individuellen Unterschiede der Infektiosität bei den insgesamt fünf geprüften Unterlagen in die Augen. Nur bei den Unterlagen mit offensichtlich geringem Virusgehalt gab es negative Abimpfungen bei einzelnen Blättern.

Der Vergleich der Ergebnisse der Serien A und B läßt erkennen, daß in den Stengeln und Blattstielen mehr Virus nachgewiesen werden konnte als in den kranken Blättern, trotz oder gerade wegen der schweren nekrotischen Symptome an den letzteren. Bei Serie A kommen durchschnittlich 0,14 Herde auf das geimpfte Blatt, bei Serie B aber 0,53 Herde. Dies läßt darauf schließen, daß das in den Blättern angelangte und dort sich vermehrende Virus unter Nekrosenbildung rasch der Inaktivierung unterliegt.

## II. Verimpfung des A-Virus in Knollensäften

Bei dem zuletzt mitgeteilten Versuch zeigten sich große individuelle Unterschiede im A-Virus-Gehalt von Einzelpflanzen der Sorte Allerfrüheste Gelbe. Dieselbe Erscheinung ist bei Saftverimpfung von Einzelknollen festzustellen. Zum folgenden Versuch wurden die Reibsäfte von fünf beliebigen, frisch vom Feld geernteten Knollen der nämlichen Sorte unter Verwendung von Karborundpuder auf Endfiedern von *demissum*-Blättern verimpft, und zwar wurden die unverdünnten oder 1 : 2 mit Wasser verdünnten Säfte auf je zwei Fiedern aufgerieben, wobei der Schalentest angewandt wurde. Das Ergebnis ist aus Tabelle 4 ersichtlich:

*Tabelle 4*
Anzahl Einzelherde

| Saft von Knolle Nr. | unverdünnt Blatt Nr. 1 | verimpft auf Blatt Nr. 2 | 1 : 2 verdünnt auf Blatt Nr. 1 | 1 : 2 verdünnt auf Blatt Nr. 2 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 11 | 6 | 5 | 12 | 34 |
| 2 | 2 | 7 | 6 | 2 | 17 |
| 3 | 62 | 80 | 24 | 26 | 192 |
| 4 | 10 | 9 | 7 | 7 | 33 |
| 5 | 18 | 45 | 23 | 34 | 120 |
| | 103 | 147 | 65 | 81 | |
| | | + 103 | | + 65 | |
| | | 250 | | 146 | |

Es zeigt sich, daß die Säfte der Knollen Nr. 3 und 5 eine bedeutend höhere Infektionskraft aufwiesen als die der übrigen. Diese Unterschiede könnten auf einer unterschiedlichen Viruskonzentration in den einzelnen Knollen oder einer unterschiedlichen Infektiosität des in ihnen enthaltenen Virus beruhen.

Die Verdünnung der Säfte mit Wasser hatte keine Erhöhung, sondern eine deutliche Erniedrigung der Infektionszahlen zur Folge.

In einem anderen Versuch mit vier beliebigen Knollen waren keine hochinfektiösen Säfte vertreten, im übrigen fiel das Ergebnis gleichsinnig aus (s. Tab. 5).

*Tabelle 5*
Anzahl Einzelherde

| Saft von Knolle Nr. | unverdünnt Blatt Nr. 1 | verimpft auf Blatt Nr. 2 | 1 : 3 verdünnt auf Blatt Nr. 1 | 1 : 3 verdünnt auf Blatt Nr. 2 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 4 | 12 | 6 | 4 | 26 |
| 2 | 8 | 4 | 1 | 11 | 24 |
| 3 | 3 | 7 | 1 | 3 | 14 |
| 4 | 4 | 13 | 4 | 13 | 34 |
| | 19 | 36 | 12 | 31 | |
| | | + 19 | | + 12 | |
| | | 55 | | 43 | |

Noch ein Versuch mit unverdünnten Reibsäften von fünf Knollen Allerfrüheste Gelbe nach Verimpfung auf je fünf Endfiedern hatte folgendes Ergebnis (Tab. 6):

*Tabelle 6*

Anzahl Einzelherde auf fünf Fiedern

| Knollen Nr.: | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 24 | 18 | 18 | 15 | 13 |
| | 17 | 15 | 15 | 11 | 12 |
| | 17 | 15 | 13 | 10 | 3 |
| | 16 | 13 | 8 | 8 | 3 |
| | 5 | 1 | 3 | 5 | 3 |
| Summen: | 79 | 62 | 57 | 49 | 34 |

Die vorstehenden Versuche lehren, daß das Verfahren zum Nachweis des in der Sorte Allerfrüheste Gelbe vertretenen Typs des A-Virus in frischen Knollen brauchbar ist. Da die Empfänglichkeit der Blätter stark schwankt, ist es notwendig, mindestens drei Blattfiedern zur Prüfung eines Saftes zu verwenden.

In einem weiteren Versuch wurden Knollen der Sorte Sabina in gleicher Weise getestet. Die Knollen stammten von A-infizierten Stauden, von denen die einen im Freiland ein gesundes Aussehen (Serie A), die anderen ein mehr oder weniger starkes Mosaik (Serie B) aufgewiesen hatten. Die Knollen wurden der Länge nach halbiert und die Säfte aus den Knollenhälften a und b getrennt auf Endfiedern von *Solanum demissum* verimpft. Über das Ergebnis unterrichtet Tabelle 7.

*Tabelle 7*

Serie A — Anzahl Einzelherde

| Knollen-Nr. | Hälften | Blatt 1 | Blatt 2 | Blatt 3 | Gesamt (a + b) |
|---|---|---|---|---|---|
| 61 | a | 4 | 5 | 5 | 21 |
| | b | 3 | 1 | 3 | |
| 54 | a | 0 | 0 | 1 | 2 |
| | b | 1 | 0 | 0 | |
| 26 | a | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | b | 0 | 0 | 0 | |
| 14 | a | 2 | 1 | 2 | 10 |
| | b | 1 | 0 | 4 | |
| 82 | a | 4 | 0 | 1 | 14 |
| | b | 2 | 9 | 3 | |

Serie B — Anzahl Einzelherde

| Knollen-Nr. | Hälften | Blatt 1 | Blatt 2 | Blatt 3 | Gesamt (a + b) |
|---|---|---|---|---|---|
| 5 | a | 0 | 0 | 12 | 13 |
| | b | 0 | 1 | 0 | |
| 25 | a | 0 | 0 | 4 | 20 |
| | b | 11 | 3 | 2 | |
| 39 | a | 0 | 1 | 1 | 11 |
| | b | 4 | 0 | 5 | |
| 103 | a | 0 | 1 | 2 | 30 |
| | b | 11 | 7 | 9 | |
| 106 | a | 6 | 4 | 3 | 23 |
| | b | 9 | 0 | 1 | |

Ergebnis: Es fallen hier die beiden Knollen Nr. 54 und 26 der Serie A durch ihre niedrigen Infektionszahlen aus dem Rahmen. Wenn man von ihnen absieht, so ist das Verhalten der Säfte unter Berücksichtigung der durch die stark unterschiedliche Empfänglichkeit der Testblätter verursachten Schwankungen bei beiden Serien als ziemlich übereinstimmend anzunehmen. Daß bei Nr. 26 keine Infektionen erzielt wurden, kann zufällig sein; es ist möglich, daß diese Knolle, ebenso wie Nr. 54, besonders wenig Virus enthielt. Jedenfalls lehrt der Versuch, daß der in Sabina verbreitete Typ des A-Virus maskiert sein kann und sich weit weniger sicher im Knollensaft nachweisen läßt als der in Allerfrüheste Gelbe enthaltene.

## III. Verschiedene Typen des A-Virus

Im September 1948 wurde eine 26 Knollen umfassende Probe der Sorte Sabina im Gewächshaus in Töpfen zur Augenstecklingsprüfung angesetzt. Bei allen Pflanzen erschien ein mehr oder minder deutliches Rauhmosaik. Preßsäfte aus den Blättern wurden auf *Datura stramonium* und junge wachsende Pflanzen von *Solanum demissum* verimpft. Die für das A-Virus immunen Datura-Pflanzen blieben, wie zu erwarten, symptomfrei*). Auf den eingeriebenen Blättern der *demissum*-Pflanzen erschienen durchweg die für das A-Virus typischen nekrotischen Einzelherde. Wider Erwarten blieben aber die Krank-

*Tabelle 8*

Verimpfung der Säfte aus 26 Sabina-Augenstecklingen zu wachsenden *Solanum demissum*-Pflanzen. Befunde bezüglich der Folgesymptome

| Pflanze Nr. | | Pflanze Nr. | |
|---|---|---|---|
| 1 | Ohne Folgesymptome (O.S.) | 14 | O.S. |
| 2 | O.S. | 15 | Akronekrose |
| 3 | Verzögerte Nekrosenbildung an den Blättern | 16 | Verzögerte Nekrosenbildung an den Blättern |
| 4 | O.S. | 17 | Schwere Akronekrose, abgestorben |
| 5 | O.S. | 18 | Akronekrose |
| 6 | Schwere Akronekrose, abgestorben | 19 | Starke Nekrosenbildung an den Blättern |
| 7 | Nekrosenbildung an den Blättern | 20 | O.S. |
| 8 | Akronekrose | 21 | Akronekrose |
| 9 | O.S. | 22 | O.S. |
| 10 | O.S. | (23) | (ausgefallen, Pilzerkrankung) |
| 11 | O.S. | 24 | Akronekrose |
| 12 | O.S. | 25 | Akronekrose |
| 13 | Schwere Akronekrose, abgestorben | 26 | Akronekrose |

*) In der Literatur (z. B. HOLMES 1948) trifft man des öfteren die irrige Angabe, daß *Datura stramonium* für das A-Virus anfällig sei. Sie geht augenscheinlich auf die von CLINCH und LOUGHNANE (1933) gemachte Feststellung zurück, daß sich das Virus durch Pfropfung in *Datura stramonium* überleiten läßt, ohne darin inaktiviert zu werden. Dies ist aber kein Kriterium für Anfälligkeit; es müßte der Nachweis erbracht werden, daß sich das Virus in *Datura* vermehrt.

heitserscheinungen nicht bei allen Pflanzen auf die eingeriebenen Blätter lokalisiert, sondern bei einem Teil der Pflanzen machten sich schwerste systemische Folgeerkrankungen bemerkbar, wie sie von uns bis dahin nach Saftverimpfungen des A-Virus noch nie erhalten worden waren, und die den Verdacht nahelegten, daß hier ein neuartiger, besonders aggressiver Typ des A-Virus vorliegen könnte. An den Spitzenblättern wurden die Nerven bis in ihre feinsten Verästelungen unter Schwarzfärbung nekrotisch, und anschließend trat Vergilben, Abwelken und Ablösen der Blätter ein. In schweren Fällen kam es zum völligen Absterben der Triebspitzen (Akronekrose) mit anschließendem Absterben des ganzen Sprosses. Es zeigten sich also dieselben Erscheinungen, die sonst nur an Sproßoberteilen von *Solanum demissum* beobachtet werden, wenn man sie auf eine A-Virus tragende Kartoffelunterlage pfropft. Dieselben schweren Symptome zeigten sich auch teilweise an den Ausläufersprossen. Im einzelnen zeigten die *demissum*-Pflanzen ein sehr unterschiedliches Verhalten (Tab. 8).

Am 29. September wurden je acht *demissum*-Blätter mit Saft aus einer der Pflanzen Nr. 3 und 7, und zwar aus Teilen, an denen Folgesymptome aufgetreten waren, eingerieben. Die Zahl der erschienenen Einzelherde je Blatt war auffallend niedrig, wie folgende Zusammenstellung zeigt:

| | Anzahl Blätter | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Saft von | ohne Herde | mit 1 Herd | mit 2 Herden | mit 3 Herden | Summe |
| Nr. 3 | 4 | 2 | 1 | 1 | 8 |
| Nr. 7 | 5 | 2 | — | 1 | 8 |

Das Ergebnis spricht für eine niedrige Konzentration des Virus im Impfsaft, offenbar als Folge einer weitgehenden Inaktivierung in den *demissum*-Pflanzen.

Bersonders schwer war die *demissum*-Pflanze Nr. 18 des obigen Versuchs erkrankt. Der Saft wurde auf eine Pflanze des Samsun-Tabaks verimpft. Am 15. Oktober wurden zum Vergleich Säfte aus jüngeren ausgewachsenen Blättern dieser und einer anderen Tabakpflanze, die mit dem alten A-Stamm P 716/17*) infiziert worden war, auf je sechs Pflanzen von *Solanum demissum* an drei Blättern verimpft. Die Impfsäfte wurden aus Blättern gleicher Stengelhöhe entnommen. Am 20. Oktober wurde folgende Feststellung gemacht: Beim P-Stamm hatte die Abimpfung das Auftreten von sehr vielen nekrotischen Einzelherden auf den Testblättern zur Folge, während die Abimpfung beim Stamm Nr. 18 insgesamt nur je einen Einzelherd an zwei Blättern ergab; am 6. November waren diese Blätter abgestorben. An allen sechs Pflanzen blieben Folgesymptome aus.

Das Ergebnis scheint zu lehren, daß der Virus-Stamm Nr. 18 im Samsun-Tabak bei weitem nicht dieselbe hohe Konzentration wie der P-Stamm erreicht. Außerdem zeigt der Infektionsverlauf, daß sich der Stamm Nr. 18 nicht konstant durch eine besondere Befähigung zur Durchdringung des

*) Aus der Sorte „Erdgold" isoliert (Köhler 1936).

*demissum*-Wirtes auszeichnet, wie das Verhalten der Ausgangspflanze hatte vermuten lassen.

Der von dem Steckling Nr. 18 auf Tabak isolierte Stamm erhielt von nun an die Bezeichnung Sab 48.

Um die Frage zu prüfen, ob sich der neue Stamm Sab 48 von dem alten P-Stamm unterscheidet — insbesondere bezüglich der Befähigung, systemische Infektionen hervorzurufen —, wurden am 4. April 1949 je fünf junge *demissum*-Pflanzen an drei Blättern durch Einreiben mit diesen Stämmen infiziert. Die Impfsäfte stammten von gleichaltrigen und gleichzeitig infizierten Pflanzen des Samsun-Tabaks.

Ergebnis: Bei dem P-Stamm war die Zahl der auf den eingeriebenen Blättern erschienenen Einzelherde bedeutend höher als bei Sab 48. Bezüglich der Folgeerkrankungen war zwischen den beiden Stämmen kein großer Unterschied festzustellen ; zwei Pflanzen der Sab 48-Serie und eine Pflanze der P-Serie wiesen überhaupt keine Folgesymptome auf, die an den anderen Pflanzen erschienenen Folgesymptome bestanden beim P-Stamm in einzelnen nekrotischen Stippen, teils an den Hauptsprossen, teils an den Ausläufersprossen. Bei Sab 48 waren teils an Haupttrieben, teils an Ausläufern nekrotische Flecken erschienen; zu so schweren Schädigungen wie bei der ersten *demissum*-Impfung kam es jedoch in keinem Fall. Am 25. April 1949 wurde der Versuch wiederholt. Wieder erzeugte der Sab 48-Stamm weniger Einzelherde als der P-Stamm. Im übrigen erschienen diesmal überraschenderweise bei keiner Pflanze beider Serien Folgesymptome. Man kann das Ergebnis vorstehender Versuche dahin zusammenfassen, daß die Befähigung zur Hervorbringung von Folgesymptomen wie vielleicht überhaupt zum systemischen Befall bei *Solanum demissum* kein spezifisches Merkmal des von Sabina isolierten A-Typs ist. Die Frage, unter welchen Voraussetzungen beim A-Virus die Infektionen auf die beimpften Blätter lokalisiert bleiben bzw. welche Umstände das Vordringen des Virus in die jungen Sproßteile begünstigen, ist noch zu klären.

Gegen eine spezifische Neigung des Sabina-Typs zur Hervorbringung von Folgesymptomen spricht auch der folgende Versuch. Am 13. Juni 1950 wurde mit Blattsäften verschiedener A-Virus-kranker Stauden der Sorten Sabina und Allerfrüheste Gelbe Verimpfungen zu jungen *demissum*-Pflanzen vorgenommen. Unter im ganzen acht Abimpfungen von Sabina kam es nur in einem einzigen Falle zu Folgesymptomen, und zwar in Form von nekrotischen Flecken an den oberen Blättern und an den Ausläufern. Unter im ganzen vier Abimpfungen von Allerfrühester Gelber führte eine zur Bildung von Folgesymptomen, und zwar kam es in diesem Fall zur besonders schweren Erkrankung mit Akronekrose. — Am wahrscheinlichsten ist wohl nach den vorliegenden Beobachtungen die Annahme, daß das A-Virus eine gewisse autonome Labilität besitzt, von der sein jeweiliges pathogenes Verhalten gegenüber *Solanum demissum* abhängt.

Weitere Vergleichsabimpfungen mit Tabaksäften bestätigen die unterschiedliche Infektiosität des Sabina- und des P-Stammes. Mit vergleichbaren Preßsäften aus gleichzeitig infizierten Tabakpflanzen (Samsun) wurden Ab-

impfungen zu Einzelblättern und auch zu ganzen Pflanzen von *Solanum demissum* vorgenommen. Vom Sabina-Virus wurde sowohl der Rohstamm Sab 48 als auch eine durch Verdünnung aus ihm isolierte Linie (bezeichnet als Sab 48 g) geprüft. Je drei Blätter wurden am 21. Mai 1949 eingerieben und nach dem Einreiben in feuchte Petrischalen gelegt (Impfserie A). Über das Ergebnis unterrichtet die folgende Tabelle 9.

*Tabelle 9*

Anzahl der Einzelherde

| | Blatt Nr. 1 | Nr. 2 | Nr. 3 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|
| 1. P 716/17 | 19 | 42 | 16 | 77 |
| 2. Sab 48 g | 2 | 1 | 2 | 5 |
| 3. Sab 48 roh | 4 | 3 | 2 | 9 |

An den je vier *demissum*-Pflanzen wurden drei Blätter eingerieben, mit nachstehendem Ergebnis (Impfserie B), Tab. 10.

*Tabelle 10*

Summe der Einzelherde

| | Pflanze Nr. 1 | Pflanze Nr. 2 | Pflanze Nr. 3 | Pflanze Nr. 4 | Gesamt |
|---|---|---|---|---|---|
| 1. P 716/17 | 102 | 42 | 35 | 78 | 257 |
| 2. Sab 48 g | 8 | 5 | 6 | 10 | 29 |
| 3. Sab 48 roh | 26 | 16 | 11 | 10 | 63 |

Es zeigt sich also wiederum, daß die Infektionskraft des Sab 48-Stammes weit geringer ist als die des P-Saftes. Dagegen besteht zwischen den beiden Sabina-Säften kein gesicherter Unterschied.

Bezüglich der Folgesymptome verhielten sich die *demissum*-Pflanzen wie folgt:

1. P 716/17: Bei zwei Pflanzen (Nr. 1 und 4) fanden sich an mittleren Blättern vereinzelte nekrotische Flecke, bei den beiden übrigen Pflanzen fehlten solche völlig.
2. Sab 48 g: Pflanze Nr. 1 war ohne Folgesymptome; bei Pflanze Nr. 2 erschien je ein nekrotischer Punkt an einem Blatt mittlerer Höhe und an einem Ausläufer. Bei Pflanze Nr. 3 fand sich ein nekrotischer Fleck an einem mittleren Blatt. Pflanze Nr. 4 bekam eine schwere Akronekrose des Haupttriebes mit vielen nekrotischen Flecken auf einem Blatt, auch war einer von zwei Ausläufern stärker nekrotisch.
3. Sab 48, roh: Bei Pflanze Nr. 1 fanden sich vier, bei Nr. 2 fünf nekrotische Flecken an mittleren Blättern. Bei Nr. 4 und 5 erschienen keine Folgesymptome.

Von neuem zeigt sich das Unberechenbare im Erscheinen von Akronekrosen. Bemerkenswert ist, daß der P-Stamm trotz der hohen Infektions-

zahlen offenbar nur in Spuren in die jüngeren Blätter vordrang; bei dem Sab 48-Stamm ist die Lokalisierung auf die eingeriebenen Blätter weniger streng, und es genügen weit weniger Infektionsherde, daß Folgesymptome auftreten. Dies könnte auf einer erhöhten Resistenz dieses Stammes gegen die in den Wanderwegen anzunehmenden Inaktivierungseinflüsse beruhen.

Der Versuch zum Vergleich der Infektiosität von Säften des Samsuntabaks wurde am 5. Mai 1950 an abgeschnittenen *demissum*-Blättern wiederholt. Mit dem Stamm Sab 48 g entstanden im Mittel von zehn Blättern 3,9 Einzelherde, mit dem P-Stamm hingegen 52,2 Einzelherde. Ein ähnlich unterschiedliches Ergebnis wurde mit Impfsäften aus dem White Burley-Tabak erzielt. Demnach scheint der A-Stamm Sab 48 im Tabak bei weitem nicht dieselbe hohe Konzentration zu erreichen wie der A-Stamm P 716/17.

Überblickt man das Verhalten des A-Virus auf unserem *Solanum demissum*-Stamm, so ergibt sich zusammenfassend das folgende Bild: Das auf die Blätter geriebene Virus führt auf diesen zur Bildung der bereits früher beschriebenen nekrotischen Infektionsherde („Einzelherde") in wechselnder Zahl. Zumeist äußern die Pflanzen keine weiteren Symptome, doch kommt es auch gelegentlich an nicht geimpften oberen Teilen zur Bildung von Einzelnekrosen, ein Zeichen dafür, daß Spuren des Virus in diese Teile vorgedrungen sind. Seltener kommt es zu einer echten systemischen Erkrankung, die durch schwere Absterbeerscheinungen an den oberen Blättern und, im Extrem, durch das Absterben des Haupttriebes von der Spitze her charakterisiert ist. Man muß annehmen, daß in solchen Fällen größere Mengen aktives Virus in die Sproßoberteile einwandern. Der auf der Kartoffelsorte Sabina vorkommende Typ des A-Virus scheint diese schwere Erkrankungsform besonders zu begünstigen.

Ein ganz ähnliches klinisches Verhalten ist von den Infektionen des Tabakmosaik-Virus an *Nicotiana glutinosa* bekannt (KÖHLER 1941, 1947). Dort ist nachgewiesen, daß der Lokalisierung der Symptome auf das beimpfte Blatt nicht auch eine Lokalisierung des Virus entspricht. Dieses wandert in den Stamm ab und wird auf dem Wanderwege inaktiviert. Nur gelegentlich dringt aktives Virus durch und verursacht dann einzelne Nekrosen, in schwereren Fällen auch ausgedehnte Absterbeerscheinungen mit Akronekrose an den Sproßoberteilen. Offenbar handelt es sich hier wie dort um denselben Resistenztyp. Dies wird auch durch das übereinstimmende Verhalten bei Pfropfungen deutlich, die bei beiderlei Objekten in der Regel zur Akronekrose führen.

Der Eintritt systemischer Erkrankung läßt sich am einfachsten aus einer Erniedrigung der Inaktivierung erklären, sei es, daß die inaktivierende Wirkung in den Wanderbahnen durch irgendwelche inneren oder äußeren Faktoren vermindert ist, sei es, daß die Resistenz des Virus gegen die inaktivierenden Einflüsse erhöht ist. Die Unberechenbarkeit im Auftreten der systemischen Erkrankung, besonders bei dem in der Sorte Sabina verbreiteten Virus, scheint auf eine labile Konstitution dieses Typs hinzudeuten. Weitere Aufklärung ist von der Auffindung einer empfindlicheren Testpflanze des A-Virus zu erwarten.

## Zusammenfassung

Die Blätter von *Solanum demissum* beantworten die Infektion durch das A-Virus mit lokaler Nekrosenbildung. Dabei ist es gleichgültig, ob das Virus dem Blatt durch Einreiben von außen oder durch Pfropfung über die Transportbahnen von innen zugeführt wird.

Versuche, mit aus den nekrotisch erkrankten Blättern gewonnenen Preßsäften Infektionen an gesunden *demissum*-Blättern hervorzurufen, waren in der Regel erfolglos, was auf eine rasche Inaktivierung des Virus in den infizierten Blatteilen schließen läßt. Dagegen ließen Abimpfungen mit dem Saft aus Blattstielen und Stengeln von auf A-kranke Kartoffelstengel gepfropften *demissum*-Sprossen auf einen höheren Virusgehalt dieser Teile schließen.

Bei der vergleichsweisen Verimpfung von Säften aus Knollen oder Sprossen gleicher Sorte zeigten sich überraschende individuelle Unterschiede bezüglich der Infektionskraft dieser Säfte; dabei ist noch ungeklärt, wieweit die aufgetretenen Differenzen durch Schwankungen des Gehalts an aktivem Virus oder etwa durch Abweichungen in der Konstitution des Virus bedingt sind. Daß mit mindestens zwei Typen des A-Virus gerechnet werden muß, beweisen vergleichsweise Abimpfungen des früher von der Kartoffelsorte Erdgold isolierten Stammes P 716/17 und des neuerdings von der Sorte Sabina gewonnenen Stammes Sab 48 mit Tabaksäften. Die Verimpfungen an *demissum*-Blättern ergaben bei dem ersteren Stamm das Vielfache der Infektionen des zweiten.

Testung auf A-Virusgehalt an *demissum*-Blättern unmittelbar mit Knollensäften ist bei „Sabina" wegen des unsicheren Infektionserfolges nicht möglich, wohl aber bei „Allerfrüheste Gelbe".

Abweichend von den bisherigen Erfahrungen bei Verimpfungen des A-Virus zu *Solanum demissum* wurden schwere systemische Erkrankungen mit dem in „Sabina" vorhandenen A-Virus beobachtet. Die großen in einem Versuche aufgetretenen Unregelmäßigkeiten in der Entwicklung des Symptombildes (von lokaler Erkrankung der eingeriebenen Blätter bis zum Absterben der ganzen Sprosse reichend) lassen darauf schließen, daß die in den Wanderbahnen von *Solanum demissum* anzunehmende Virusinaktivierung von sehr labilen Faktoren abhängt; dabei ist vermutlich auch eine labile Konstitution des Virus anzunehmen.

## Literaturverzeichnis

Clinch, P. und Loughnane, J. B., 1933: A study of the crinkle disease of potatoes and of its constituent or associated viruses. Sci. Proceed. Roy. Dublin Soc. 40, 567—596.

Holmes, F. O., 1948: The filtrable viruses. Suppl. 2, Bergey's Manual Determinative Bacteriology. Edit. VI. Baltimore.

Köhler, E., 1936: Fortgeführte Untersuchungen über den Kartoffelabbau. Landw. Jahrbücher **82**, 379—408.

— —, 1937: Über ein „Veinbanding-Virus" der Kartoffel. Phytopath. Ztschr. **10**, 17—29.

— —, 1940: Weitere Studien über die Vira der Y-Gruppe der Kartoffel. Phytopath. Ztschr. **12**, 480—489.

— —, 1941: Über die Resistenzeigenschaften von *Nicotiana glutinosa* gegenüber dem Tabakmosaikvirus. Ztschr. f. Pflanzenkrankh. **51**, 449—462.

— —, 1947: Studien über den Infektionsverlauf bei Verimpfung des Tabakmosaik- und des Paratabakmosaikvirus auf *Nicotiana glutinosa* und *N. tabacum* (var. White Burley). Ein Beitrag zum Resistenzproblem. Arch. gesamte Virusforschg. **3**, 303—326.

— —, 1948: Ein Schnellverfahren zum Nachweis des Kartoffel-A-Virus. Kartoffelwirtschaft **1**, 56.

— — und Paukšens, J., 1944: *Solanum demissum* Lindl. als Testpflanze verschiedener Mosaikviren. Züchter **16**, 8—11.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich*
*Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann*

# Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr.

Von

F. Turel

*Mit 15 Abbildungen*

Inhalt: Einleitung. — 1. Der Pilz. Allgemeine Beschreibung bei Kultur auf verschiedenen Nährböden. — 2. Myzelwachstum bei Anwesenheit von Aneurin in der Nährlösung; a) $Richard_4$ + Aneurin, b) $Richard_4$ + Aneurin in verschiedenen Konzentrationen; c) $Raulin_4$ + Aneurin; d) $Richard_4$ + $ZnSO_4$ + Aneurin; e) $Richard_4$ + Aneurin (zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung zugegeben), aa) Theoretische Überlegungen über Früh- und Spätphase, bb) Experiment. — 3. Toxinproduktion von *Fusarium solani*; a) Bekanntes über die Chemie der Toxine von *Fusarium solani;* b) Testmethode, aa) Technische Durchführung, bb) Beurteilung der Resultate, cc) Der Standard; c) Toxinproduktion ohne Aneurin in der Nährlösung, aa) Temperatur-Zeitversuch auf $Richard_4$, bb) Temperatur-Zeitversuch auf $Raulin_4$; d) Toxinproduktion bei Anwesenheit von Aneurin, aa) $Richard_4$ + Aneurin, bb) $Richard_4$ + Aneurin in verschiedenen Konzentrationen, cc) $Raulin_4$ + Aneurin, dd) $Richard_4$ + $ZnSO_4$ + Aneurin, ee) Diskussion, ff) $Richard_4$ + Aneurin (zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung zugegeben), gg) Toxizitätssteigerung durch Aneurin, bezogen auf Myzelgewicht. — 4. Myzeluntersuchungen von *Fusarium solani* auf seinen Gehalt an Wachstumsfaktoren mit Hilfe einer *Phycomyces*-Art; a) Diskussion und Problemstellung; b) Testmethode, aa) Testpilz und Nährlösung, bb) Extraktion des *Fusarium*-Myzels, cc) Verwertung der Resultate; c) Untersuchung der Myzelien von verschiedenen Nährlösungen, aa) $Richard_4$, bb) $Raulin_4$, cc) $Richard_4$ + $ZnSO_4$, dd) $Richard_4$ + Aneurin. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

## Einleitung

In Vorversuchen auf Richard-Lösung mit 4 bis 5 % Glukose zeigte sich, daß *Fusarium solani* eine ansehnliche, mit Hilfe von Bakterien gut meßbare Toxinproduktion aufwies. Diese leichte Meßbarkeit war der Anlaß dazu, die Bedingungen und die Beeinflußbarkeit der Entwicklung und des Stoffwechsels hier näher zu untersuchen.

Gemäß der primären Fragestellung, bei der das Schwergewicht auf den Bedingungen der Toxinproduktion lag, wurde auch in den Experimenten zu Anfang vor allem auf die Toxizitätsmessung Wert gelegt. Erst bei der Ver-

wendung von Vitaminzusätzen im Nährsubstrat, die überraschenderweise nicht nur den Toxinstoffwechsel, sondern auch das Wachstum des Pilzmyzels in ganz auffälliger Weise veränderten, wurde auch dieser Seite des Problems größere Beachtung geschenkt. Um die Darstellung der Ergebnisse übersichtlicher zu gestalten, wurden aber die Erscheinungen des veränderten Wachstums und der veränderten Toxinproduktion getrennt behandelt, obgleich sie meistens an den selben Versuchen beobachtet wurden.

## 1. Der Pilz. Allgemeine Beschreibung bei Kultur auf verschiedenen Nährböden

*Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. wurde als Reinkultur vom Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn bezogen.

Auf Malzagar war die Bildung von Luftmyzel nicht sehr stark. Nach ein bis zwei Wochen begann jeweils die reichliche Anlage von schleimigen, anfangs ockerbraunen, später blaugrünen Sporenlagern besonders an den bei der Impfung direkt bestrichenen Stellen der Kultur. Der Agar färbte sich mit der Zeit braunrot.

Sporenbildung und Färbung der Kulturen wie des Nährmediums waren stark abhängig von der Zusammensetzung des letzteren.

Während auch auf Richard-Lösung mit 4 % Glukose ($Ri_4$, Zusammensetzung siehe Fußnote) die starke Schleimbildung und eine ockerbraune Färbung im Zusammenhang mit der reichlichen Sporulation charakteristisch war, so daß man auf den ersten Blick fast den Eindruck glänzender Hefe- oder Bakterienkulturen hatte, konnte auf der anders zusammengesetzten Raulin-Lösung mit gleichviel Glukose ($R_4$, Zusammensetzung siehe Fußnote) selbst nach mehrmonatiger Wachstumsdauer bei Temperaturen von 3° bis 37° C keine Konidienbildung beobachtet werden. Der Pilz bildete auch kein Luftmyzel und hatte eine angenehme rotviolette Färbung. Schlossen sich auf $Ri_4$ die einzelnen, schwach pelzigen Kolonien bei einer Beimpfung von etwa 1 000 000 Konidien/100 ccm bis etwa zum 14. Tag weitgehend zu einer zusammenhängenden, nur leicht welligen Myzeldecke, so war das auf $R_4$ nie der Fall. Die einzelnen Kolonien blieben gut getrennt nebeneinander, auch wenn sie sich berührten, und waren nach oben gewölbt, so daß die Oberfläche der gesamten Kultur stark runzelig erschien.

Um die Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit von verschiedenen Temperaturen zu ermitteln, wurden Malzagar-Petrischalen (9 cm ⌀) in der Mitte mit einer möglichst kleinen Menge Konidien beimpft. Je sieben Schalen wurden bei Temperaturen von 3, 6, 9, 12 ... bis 37° C in der Dunkelheit angesetzt und alltäglich zur gleichen Zeit der Durchmesser des bewachsenen Teiles gemessen. Der Mittelwert aus den sieben Parallelen ergab je einen Kurvenpunkt.

$Ri_4$: In 1000 ccm Lösung 10 g $NH_4NO_3$, 5 g $KH_2PO_4$, 2,5 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$ und 0,02 g $FeCl_3$.

$R_4$: In 1500 ccm Lösung 4 g Weinsäure, 4 g Ammontartrat, 0,6 g $K_2CO_3$, 0,6 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0,4 g $MgCO_3$, 0,25 g $(NH_4)_2SO_4$, 70 mg $ZnSO_4$ und 70 mg $FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$.

Unter diesen Bedingungen lag das Optimum für das Myzelwachstum bei 27 ° C. Die maximale, noch erträgliche Temperatur betrug 34 ° Celsius; bei 37 ° wuchs der Pilz auf Malzagar praktisch gar nicht mehr.

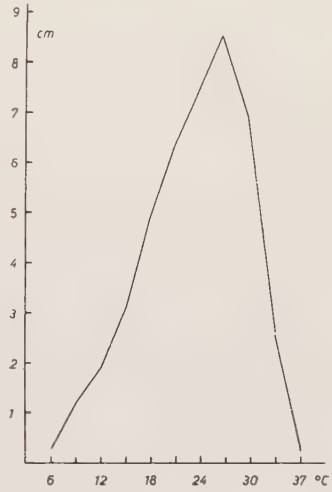


Abb. 1. Wachstum von *Fusarium solani* auf Malzagarplatten bei verschiedenen Temperaturen nach 8 Tagen. Abszisse: Temperatur. Ordinate: Durchmesser der bewachsenen Fläche

## 2. Myzelwachstum bei Anwesenheit von Aneurin in der Nährlösung

Bei einem Vorversuch hatte sich gezeigt, daß durch die Zugabe von Aneurin *Fusarium solani* im Verlauf seiner Entwicklung wesentlich verändert wurde. Um die hierbei auftretenden Erscheinungen genau verfolgen zu können, wurden alle weiteren Versuche bei 18 ° C durchgeführt, was auch für die später zu besprechende Messung der Toxinproduktion eine günstige Temperatur darstellte.

Die für Aneurinversuche benutzten 500-ccm-Erlenmeyer wurden über Nacht in Putzsäure gelegt, um alle Spuren organischer Substanz sicher zu beseitigen. Danach wurden sie gründlich mit Brunnenwasser und schließlich mit destilliertem Wasser gespült. Die Richard-Lösung mit 4 % Glukose puriss. wurde in gewöhnlicher Weise zubereitet, ebenso die Raulin-Lösung, und vor dem Sterilisieren das Aneurin zugegeben. Die Erlenmeyer wurden nun mit je 100 ccm der jeweiligen Lösung versehen und, verschlossen mit einem Stopfen aus entfetteter Watte, bei 110 ° C im Autoklaven sterilisiert.

Die Impfdichte betrug etwa 900 000 bis 1 000 000 Konidien pro Kolben. Diese außerordentlich große Anzahl von Keimen war nötig, da sich das gutwachsende Myzel nach relativ kurzer Zeit offensichtlich durch seine eigenen Ausscheidungen an einer weiteren Entwicklung verhindert, was durch große Impfdichte weitgehend wieder gutgemacht werden kann.

### a) Wachstum auf Richard$_4$ + Aneurin

Schon bei der Betrachtung von zehn- bis zwölftägigen Kulturen war in Hinsicht auf das Myzelwachstum makroskopisch ein deutlicher Aneurineffekt zu konstatieren: Während sich im gewöhnlichen Ri$_4$ eine schöne feste Oberflächenkultur bildete, die sich, von zahlreichen kleinen Einzelkolonien ausgehend, bald zu einer zusammenhängenden Myzeldecke geschlossen hatte, bildete das Fusarium bei Anwesenheit von 100 $\gamma$ Aneurin/Liter keine feste Oberflächenkultur. Es blieb auch nach mehrwöchigem Wachstum bei einzelnen kleinen, durch etwas stärker ausgebildetes helles Luftmyzel flaumig erscheinenden, hellockerfarbigen Kolonien an der Oberfläche der Nährlösung, während die Hauptmasse sich submers entwickelte.

Begann man mit den Messungen der Myzelgewichte aber schon ganz zu Anfang der Entwicklung, am dritten oder vierten Tage, so zeigte sich, daß der Pilz offenbar nicht während der ganzen Zeit des Wachstums in gleicher Weise auf Aneurin reagierte, sondern daß man zwei verschiedene Stadien unterscheiden mußte:

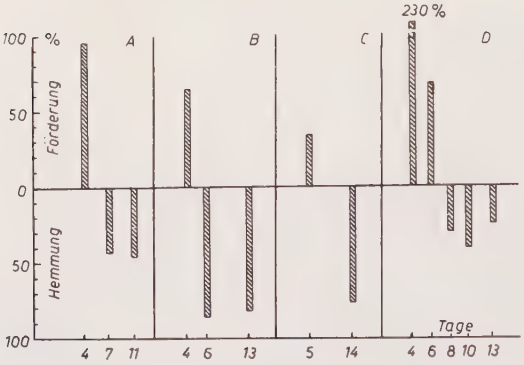



Abb. 2. Durch Aneurin hervorgerufene Förderung und Hemmung des Wachstums von *Fusarium solani* bei Kultur auf Richard$_4$. A—D: vier verschiedene Versuche. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Förderung u. Hemmung in % des Myzelgewichtes

Das erste Stadium dauerte von der Impfung bis zum sechsten, höchstens bis zum siebenten Tag. Während dieser Frühphase, in der das Wachstum auch bei den Kontrollen noch weitgehend submers vonstatten ging und wo erst zum Schluß das plötzliche Erscheinen der Ansätze zu kleinen Oberflächenkolonien eine einigermaßen sichere makroskopische Beurteilung eventueller Wachstumsunterschiede ermöglichte, zeigten die Zahlen der Trockengewichtsbestimmungen einen deutlichen, dem späteren Stadium entgegengesetzten Aneurineffekt: Das Wachstum wurde durch Anwesenheit des Vitamins gefördert, so daß das Trockengewicht um etwa 50 %, gelegentlich sogar um 100 bis 200 % gesteigert wurde.

Im zweiten Stadium, etwa vom siebenten Tage an, wurde dann ziemlich plötzlich die hemmende Wirkung des Aneurins sichtbar. Auch die Myzelmessungen ergaben nun ein erhebliches Manko an Trockensubstanz in den Vitaminkolben. Verfolgte man die Entwicklung längere Zeit hindurch, so zeigte sich, daß der Myzelzuwachs immer vermindert war, sich aber oft über eine bedeutend längere Zeitspanne erstreckte, so daß der Kurvenanstieg flacher und stetiger erschien. Die Myzelgewichte erreichten aber trotzdem nie ganz die Maximalwerte der Kontrollen.

### b) Wachstum auf Richard$_4$ + Aneurin in verschiedenen Konzentrationen

Die Vitaminkonzentration im ersten Versuch war mit 100 $\gamma$ pro Liter Nährlösung offenbar zufällig günstig gewählt worden, um die Aneurineffekte sicher messen zu können. Um aber zu sehen, ob *Fusarium solani* auf verschiedene Mengen Aneurin in unterschiedlicher Weise reagierte, mußten Serienversuche angesetzt werden, in denen man die Vitaminkonzentration variierte. Im ersten Fall betrugen die Gaben Aneurin/Liter Ri$_4$ 25, 50, 100, 200, 400 und 800 $\gamma$.

Bei den Myzelmessungen zeigte sich sehr bald, daß sich die verschiedenen Reihen im Prinzip alle gleich verhielten. Die auftretenden Unterschiede waren

sicher nichts anderes als Streuungen. Daher wurden nur noch die Reihen mit 50, 200 und 800 $\gamma$/l verfolgt und von den anderen Stichproben entnommen. Die Kurvenpunkte sind die Mittelwerte aus allen Aneurinreihen.

Aus den Resultaten dieser Versuchsserie war zu ersehen, daß wir das Aneurinquantum oberhalb einer voll wirksamen Grenzkonzentration offenbar in hohem Maße steigern dürfen, ohne Unterschiede in der Wirkung feststellen zu können. Förderung während der Frühphase sowie Hemmung während der Spätphase traten überall in gleicher Weise auf. Irgendwelche zusätzlichen oder verstärkten Hemmungserscheinungen waren auch bei der höchsten Konzentration von 800 $\gamma$/l nicht vorhanden, ganz im Gegenteil zeigte diese Kurve zufällig fast die höchsten Myzelgewichte.

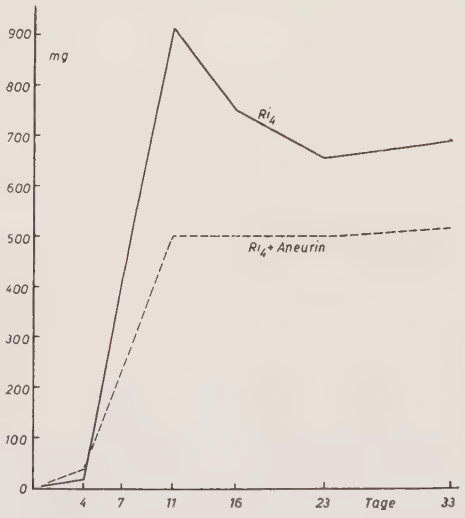



Abb. 3. Wachstum von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ + 50 bis 800 $\gamma$ Aneurin/l. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: mg Myzel pro Kolben

In einer zweiten Versuchsserie wurden dann die Abstufungen der Aneuringaben weiter gewählt, um sicher die untere Grenze der Wirksamkeit zu erfassen. Die zugesetzten Mengen Vitamin betrugen 0,01, 0,1, 1,0 10,0, 100,0 und 1000 $\gamma$ Aneurin/Liter Ri$_4$.

Die Erscheinungen bei den hohen Konzentrationen bestätigten nochmals, was schon beim vorhergehenden Versuch beschrieben wurde, und irgendein verstärkter Hemmungseffekt wurde auch bei einer Aneurinmenge von 1000 $\gamma$/l Ri$_4$ nicht konstatiert.

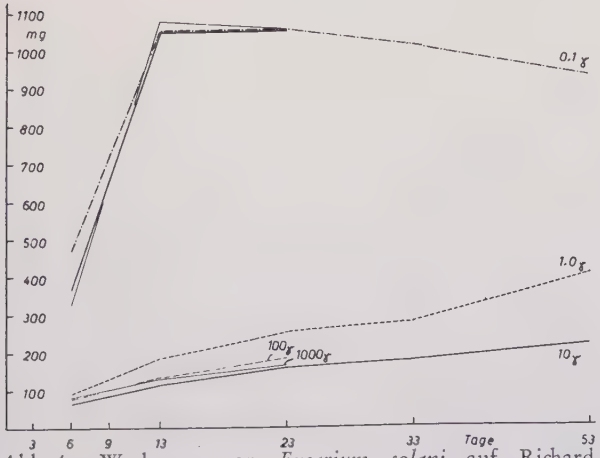



Abb. 4. Wachstum von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ + verschiedene Mengen Aneurin/l. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: mg Myzel pro Kolben

Die volle Wirksamkeit konnte offenbar noch ausgeübt werden, wenn sich das Vitamin in einer Konzentration von 10 $\gamma$/l in der Nährlösung vorfand. Verdünnte man auf $^1/_{10}$, so war der Effekt ebenfalls noch stark. Dagegen hob sich diese Reihe mit 1 $\gamma$/l schon bei den beiden

ersten Messungen, deutlicher aber später, von der ersten Gruppe ab. Es handelte sich hier um eine suboptimale Konzentration, bei der das Aneurin nicht mehr zu voller Wirksamkeit kommen konnte. Nach etwa 50tägigem Wachstum zeichneten sich diese Kolben auch makroskopisch dadurch aus, daß das spärliche, flockige Oberflächenmyzel sich plötzlich sichtlich vermehrte, so daß die Pilzdecke sich nahezu schloß. Dies machte sich bei den Gewichtsmessungen in einem steileren Anstieg der Wachstumskurve gegenüber den höheren Aneurinkonzentrationen bemerkbar. Ob zu diesem Zeitpunkt das verfügbare Vitamin soweit aufgebraucht oder zersetzt war, daß es seine ungünstige Wirkung nicht mehr voll entfalten konnte und die noch verfügbaren Nährionen zu einem sehr verspäteten Wachstumsschub führten, muß dahingestellt bleiben, da keine Messungen des Vitamingehaltes im Kulturfiltrat angestellt wurden. Es ist nur zu bemerken, daß auch die Reihen mit höheren Aneurinkonzentrationen entsprechende Wachstumsschübe zeigten, nur erst etwa drei Wochen später.

Wären die Abstände der einzelnen Verdünnungen kleiner gewählt worden, so hätte sich sicher ein Übergang vom Typus der ersten Gruppe zum Typ der Kontrolle ohne Aneurin mit allmählich abnehmender Wirkung auf das Wachstum ergeben.

Bei der vorliegenden Versuchsserie dagegen repräsentiert nur die Reihe mit 1 $\gamma$ Aneurin/l die Reaktion von *Fusarium solani* auf eine suboptimale Konzentration.

Vergleichen wir die folgende Kurve mit 0,1 $\gamma$/l mit der Kontrolle, so zeigt sich eindeutig, daß hier das Vitamin bereits in zu geringer Menge vorlag, um noch irgendeine meßbare Wirkung auf das Wachstum auszuüben. Das gleiche ist selbstverständlich der Fall bei einer Gabe von 0,01 $\gamma$/l. Beide Kurven laufen praktisch der Kontrolle parallel.

Wir stellen also fest, daß wir bei *Fusarium solani* in bezug auf das Wachstum und die Reaktion auf verschiedene Konzentrationen von Aneurin drei Typen unterscheiden können:

1. Maximale Aneurinwirkung bei Gaben über 10 $\gamma$/l $Ri_4$ ohne zusätzliche Schädigung bis zu Gaben von 1000 $\gamma$/l. Förderung während der Frühphase und Hemmung während der Spätphase überall gleich groß.
2. Suboptimale Wirkung innerhalb der Konzentrationen 10 und 0,1 $\gamma$/l. Hier nimmt die Wirkung ab mit sinkender Aneurinkonzentration.
3. Keine Wirkung bei Gaben von etwa 0,1 $\gamma$/l und weniger. Alle Myzelgewichtskurven laufen in diesem Falle der Kontrolle ohne Aneurin parallel.

Vergleichen wir nun die beiden letzten Versuchsserien miteinander, besonders ihre Kontrollkurven, so fallen uns sofort große Unterschiede im typischen Verlauf auf: In der ersten Serie, wo die Aneurinkonzentrationen 50 bis 800 $\gamma$/l untersucht wurden, erreichte der Pilz in den Kontrollen sein Gewichtsmaximum bereits nach elf Tagen; in der zweiten Serie mit den Konzentrationen 0,01 bis 1000 $\gamma$/l erst zwei Tage später. Dann trat in der ersten Serie

eine starke Alterung des Myzels ein, so daß die Trockengewichte schon vier Tage nach der Erreichung des Maximums von über 900 mg/Kolben auf 750 mg/Kolben absanken. Bis zum Schluß des Versuches nahmen sie weiter ab und betrugen zuletzt etwa 700 mg Kolben. In der zweiten Serie dagegen war nach dem 13. Tage mit gut 1000 mg/Kolben bis zum 33. Tage fast keine Schrumpfung des Myzels zu beobachten; erst nach sieben- bis achtwöchiger Versuchsdauer konstatierte man einen etwa 10prozentigen Trockengewichtsschwund.

Entsprechend dem unterschiedlichen Verlauf der Kontrollkurven verhielten sich auch die mit voller Aneurinwirkung. In der ersten Serie war der Anstieg bis zum elften Tage steiler. Danach verliefen die Kurven fast waagerecht. In der zweiten Serie dagegen zeigte sich ein fast geradliniger, in stetem Anstieg begriffener Zuwachs bis zum 53. Tage.

Was für den Mechanismus der Aneurinwirkung aber besonders wichtig erscheint: Der Grad der Hemmung war sehr verschieden in den beiden Serien. In der ersten bewirkte Aneurin eine Verminderung des maximalen Trockengewichtes auf gut 50 % der Kontrollen, in der zweiten auf knapp 25 %.

All diese Unterschiede sind wahrscheinlich auf verschiedenes Alter des Impfmaterials zurückzuführen. Bei der zweiten Serie wurde ein Kolben benutzt, der schon über fünf Monate lang bei Zimmertemperatur aufbewahrt worden war. Da die Keimkraft der Konidien im Tropfenversuch auf einem Objektträger immer noch über 80 % betrug, bestanden keine Bedenken, den Großversuch damit zu impfen.

Nun ist zu sagen: Die prinzipielle Reaktion des *Fusarium*-Stammes war in beiden Versuchen gleich. Im Frühstadium trat deutliche Förderung des Wachstums auf, im Spätstadium deutliche Hemmung. Wie sich bei einem nachträglichen Vergleichsversuch auf kleinerer Basis herausstellte, waren auch die Grenzkonzentrationen, bei denen maximale, suboptimale und gar keine Wirkung auftrat, ganz ähnlich. Es wurde daraus geschlossen, daß der Einfluß des Alters der Impfmaterialien nur gradueller Natur war, die hier zu demonstrierenden Haupteffekte dagegen nicht verwischte. So konnte auf eine Wiederholung im Großen verzichtet werden; sie wäre sinnlos, weil über die Art der Wirkung von Aneurin auf *Fusarium solani* unter den gegebenen Umständen kein Zweifel besteht.

### c) Wachstum auf Raulin$_4$ + Aneurin

Schon in der allgemeinen Beschreibung des Pilzes ist auf die ganz andere Art der Entwicklung hingewiesen, die *Fusarium solani* auf Raulin$_4$ nimmt. Es zeigt andere Färbung, keine Entwicklung von Luftmyzel und vor allem absolut keine Konidienbildung. Unter diesen Umständen schien es interessant, ob der Pilz Aneurin gegenüber ein anderes Verhalten zeigte als auf Richard$_4$.

Zur normalen Raulin-Lösung wurden also 100 $\gamma$ Aneurin/l zugesetzt, um sicher eine Wirkung zu erreichen, falls diese überhaupt statthaben konnte.

*Tabelle 1*

Wachstum von *Fusarium solani* auf $Raulin_4$ + 100 $\gamma$ Aneurin/l
(Myzelgewichte in mg/Kolben)

| Alter in Tagen | 4 | 10 |
|---|---|---|
| $Raulin_4$ + Aneurin | 33 | 582 |
| Kontrolle | 21 | 557 |

Die Stimulation während der Frühphase trat deutlich und in gleicher Stärke auf wie bei Versuchen auf $Richard_4$ + Aneurin.

Nach dem Übergang zur Spätphase konnte jedoch keine hemmende Wirkung des Vitamins in bezug auf die Trockengewichtszunahme festgestellt werden. Die Myzelgewichte waren im Versuch wie in der Kontrolle gleich hoch, und auch makroskopisch waren keinerlei Unterschiede sichtbar. Die Oberflächenkulturen bildeten sich zu gleicher Zeit und in gleicher Stärke, und die Bildung von Luftmyzel wurde durch Aneurin auch nicht spurenweise angeregt. Auch die Färbung war vollkommen gleich.

Die nächste Frage lautete nun: Wodurch wird in der Raulin-Lösung die Aufhebung des Hemmungseffektes bedingt, wie muß man also die Richard-Lösung modifizieren, damit auch dort nur die Förderung während der Frühphase sichtbar wird?

Bei der Durchsicht der in beiden Nährböden vorhandenen Bestandteile fällt vor allem das Zink (außer Eisen, welches in beiden Lösungen zugegeben wird) als zusätzliches Spurenelement der Raulin-Lösung auf. Zwar ist auch die Stickstoffversorgung gegenüber Richard verändert, was wahrscheinlich für das typische Wachstumsbild ebenfalls von Bedeutung ist. Diese Frage konnte aber im weiteren Verlauf der Untersuchungen nicht berücksichtigt werden.

Vorerst wurde der Einfluß von $ZnSO_4$ näher studiert.

### d) Wachstum auf $Richard_4$ + $ZnSO_4$ + Aneurin

Das Salz wurde der aneurinhaltigen Richard-Lösung in gleicher Konzentration wie dem vorher benutzten Raulin-Nährmedium zugesetzt, nämlich 40 mg $ZnSO_4$/l. Außerdem wurden aber sofort Parallelreihen mit gleichem Impfmaterial angesetzt, in denen 10 mg/l und 2,5 mg/l zugegeben waren. Wie sich im Verlauf der Messungen herausstellte, reagierte *Fusarium solani* aber in allen drei Reihen mit $ZnSO_4$ gleich, so daß diese als Parallelversuche zu werten waren und das Resultat lediglich bekräftigten.

Betrachtet man Tabelle 2, so ist aus den Messungen vom dritten Tage zu ersehen, daß auch hier die Förderung der Frühphase durch Aneurin in vollem Ausmaß stattfand. Bereits am vierten Tage dagegen waren die Verhältnisse etwas verändert: Die Kolben mit $ZnSO_4$-Zusatz bekamen einen deutlichen Vorsprung im Myzelgewicht, und gleichzeitig verwischte sich der Förderungseffekt gegenüber den Kontrollen. Am sechsten Tage war das Wachstum schon so beschleunigt, daß die Kulturen in $Richard_4$ + $ZnSO_4$ etwa dreimal so viel Trockengewicht produziert hatten wie diejenigen ohne das zusätzliche Spurenelement. Die Myzelgewichte waren mit und ohne Aneurinzusatz praktisch

*Tabelle 2*
Wachstum von *Fusarium solani* auf $Richard_4$ + 50 γ Aneurin/l (= A) und versch. Mengen $ZnSO_4$ (K = Kontrolle ohne $ZnSO_4$)

| $ZnSO_4$ mg/l | 3. Tag | | 4. Tag | | 6. Tag | | 8. Tag | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mg | pH | mg | pH | mg | pH | mg | pH |
| K+A | 25 | 4,2 | 45 | 4,2 | 49 | 4,5 | 69 | 4,6 |
| K | 15 | 4,2 | 25 | 4,2 | 92 | 4,3 | 246 | 4,1 |
| 40+A | 25 | 4,2 | 69 | 3,9 | 290 | 3,5 | 549 | 2,9 |
| 40 | 14 | 4,2 | 54 | 3,9 | 303 | 3,5 | 527 | 3,0 |
| 10+A | 24 | 4,2 | 63 | 4,0 | 289 | 3,7 | 480 | 3,0 |
| 10 | 13 | 4,2 | 35 | 4,1 | 262 | 3,7 | 529 | 3,0 |
| 2,5+A | 23 | 4,2 | 67 | 4,0 | 232 | 3,9 | 471 | 3,0 |
| 2,5 | 18 | 4,2 | 46 | 4,0 | 308 | 3,7 | 554 | 3,2 |

gleich hoch und blieben es auch in Zukunft: Der bei den Kontrollen bereits deutlicher einsetzende Hemmungseffekt durch das Vitamin blieb aus. Am achten Tage waren die Unterschiede $Richard_4$ : $Richard_4$ + $ZnSO_4$ nur noch gleich 1 : 2. Der Vorsprung verminderte sich bei weiterer Entwicklung immer mehr, und gegen Abschluß des Wachstums, der in allen Reihen ohne Aneurin etwa am 14. Tage stattfand, betrugen die Myzelgewichte gleichmäßig fast genau 1000 mg/Kolben.

Schon auf der Raulin-Lösung hatte sich ein beschleunigtes Wachstum gezeigt, nur nicht so ausgeprägt und nicht so lange anhaltend wie auf $Richard_4$ + $ZnSO_4$. Sehr bald stoppte der Zuwachs, und das Höchstgewicht ging kaum über 600 mg/Kolben, also gut die Hälfte der Richard-Kulturen bei gleichem Glukosegehalt. Der Anfang der Entwicklung unseres Pilzes scheint also vorwiegend durch $ZnSO_4$ bestimmt und daher in beiden Fällen sehr ähnlich zu sein; bald wirken sich aber die verschiedenen Nährionen der Richard- und Raulin-Lösung aus und bedingen eine divergente Entwicklung gegen das Ende hin. Dies gilt nicht nur für den Zuwachs an Trockensubstanz, sondern auch für die Färbung.

Am sechsten bis siebenten Tage begannen sich nämlich die Oberflächenkolonien auf $Richard_4$ + $ZnSO_4$ in gleicher Weise rosa zu färben wie die Raulin-Kulturen. Während das aber bei den letzteren ein bleibendes Merkmal war, wich das Rosa auf dem veränderten Richard bald einem dunklen Ocker im Gefolge der Ausbildung von samtartig kurzem Oberflächenmyzel. Nach etwa zwölf Tagen begann zudem sehr lebhafte Konidienbildung, stärker und rascher als auf $Richard_4$ ohne $ZnSO_4$. Die Oberfläche der Kulturen war aber stärker gerunzelt, also wieder etwas ähnlich wie auf Raulin.

$ZnSO_4$ schien sich also in diesem speziellen Fall besonders zu Beginn der Spätphase bei *Fusarium solani* auszuwirken. Zu dieser Zeit bestimmte es weitgehend Wachstumsgeschwindigkeit, Entwicklung des Luftmyzels, Form und Farbe der Oberflächenkulturen. Auch annullierte es die Hemmungswirkung des Aneurins. Je nachdem aber, ob die Nährstoffe nach Raulin oder Richard zusammengesetzt waren, wirkten diese sich in der Folge verschieden aus. So erhielten sich auf Raulin-Lösung die Erscheinungen bis zum Entwicklungsabschluß, bis zur Alterung der Myzelien, wogegen sie auf Richard bald überdeckt wurden, so daß die typischen Merkmale einer Kultur ohne Zinkzusatz zum Schluß dominierten. (Siehe auch Messungen des Wuchsstoffgehaltes im Myzel S. 339.)

Ein Tastversuch mit $Raulin_4$ ohne $ZnSO_4$ zeigte, daß auch in dieser Lösung eine Aufhebung der Wachstumshemmung stattfand und die Kulturen schön rosa gefärbt blieben, ohne Luftmyzel und Konidien zu bilden. Daraus konnte entnommen werden, daß bei der veränderten Reaktion des *Fusariums* Zinksulphat nicht der einzige auslösende Faktor war, obgleich auch er allein die Wirkung des Vitamins verhindern konnte.

### e) $Richard_4$ + Aneurin (nachträglich zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung zugegeben)

#### aa) Theoretische Überlegungen über Früh- und Spätphase

Um die bisherigen Hauptresultate zu rekapitulieren, können wir sagen: *Fusarium solani* ist ein auf synthetischen Nährböden mit Glukose und Salzen gut wachsender Pilz. Auf Lösungen geeigneter Zusammensetzung lassen weder Entwicklungsgeschwindigkeit noch Sporulation zu wünschen übrig. Es ist also fähig, seinen Wuchsstoff- und Enzymbedarf durch eigene Synthese zu decken. Nach SCHOPFER kann man sagen, es ist auxoautotroph.

Trotzdem zeigt es bei Zugabe gewisser Quantitäten von Aneurin anfangs eine positive Reaktion: sein Wachstum wird gefördert, wird beschleunigt. Diese günstige Wirkung des Vitamins hat nur begrenzte Dauer. Sie ist nach höchstens sieben Tagen Wachstum bei 18 ° C beendet. Veränderungen der Nährlösung in der oben beschriebenen Weise, also vor allem der Zink- und Stickstoffversorgung, haben auf den Ablauf dieses Vorganges keinen Einfluß.

Danach tritt der Pilz offenbar in eine neue Phase seiner Entwicklung ein. Auf dem einen Nährboden dauert eine Beeinflussung seiner Stoffwechselvorgänge durch Aneurin an. Jetzt macht sie sich aber nicht mehr in einer Förderung, sondern in einer deutlichen Hemmung des Wachstums geltend. Auf dem anderen Nährboden hingegen hört eine Aneurinwirkung nach Abklingen der Frühphase auf. Aneurinkulturen und Kontrollen werden in ihren Myzelgewichten immer ähnlicher und schließlich identisch.

Es scheint also, daß die beiden Phasen einander nicht bedingen. Unter geeigneten Umständen können sie wohl aufeinanderfolgend am gleichen Objekt in Erscheinung treten, bei veränderter Ernährung kann aber auch nur der Früheffekt auftreten und der Späteffekt ausbleiben. Nun fragt sich umgekehrt: Erhalten wir auch gesondert den Späteffekt, also eine Wachstumshemmung bei über siebentägigen Kulturen, ohne daß im Frühstadium eine

Aneurinwirkung durch Vitamingaben von außen auf *Fusarium solani* ausgeübt wurde?

Zur Beantwortung dieser Frage wurde ein Versuch auf Richard$_4$ angesetzt. Er wurde in sechs Teile geteilt und diese folgendermaßen behandelt:

**bb) Experiment**

1. Nur Beimpfung mit der Sporensuspension von *Fusarium solani.* Kein Aneurinzusatz (= K, Kontrolle).
2. Gleichzeitig mit der Impfung Zugabe von 100 $\gamma$ Aneurin/Liter (= KA, Kontrolle + Aneurin).
3. Zusatz der gleichen Menge Aneurin am zweiten Tag (2),
4. am dritten Tag (3),
5. am vierten Tag (4) und
6. am siebenten Tag (7) nach der Beimpfung.

(Die Bezeichnungen in Klammern beziehen sich auf die folgende Figur.)

Die Messungen am dritten Tage zeigten diesmal noch keine Unterschiede. Erst am fünften Tage war bei KA und (2) der Förderungseffekt der Frühphase deutlich, bei KA stärker ausgeprägt als bei (2), entsprechend der längeren Wirkungsdauer des Vitamins. Am 14. Tage, bei maximaler Entwicklung der Kontrolle, wurde dann die ganze Abstufung sichtbar. Entsprechend den schlechteren Anfangsbedingungen und der darauffolgenden vollen Auswirkung der Wachstumshemmung blieben die Werte von Reihe (2) immer unter denen von Reihe KA. Der typische flache und lange andauernde Anstieg war aber für beide gleich charakteristisch. Die Kurven (3) und (4) zeigten eine stärkere Gewichtszunahme des Pilzes an, die Werte blieben aber doch wesentlich hinter dem Maximum von K. zurück. Am typischen Verlauf war wieder die Hemmungswirkung des Aneurins schuld, ohne daß in diesem Fall ein Effekt während der Frühphase konstatiert wurde. Sogar Reihe (7), die allerdings schon deutliche Merkmale der Kontrolle aufwies, zeigte in ihrem schwach ausgeprägten Maximum noch 25 % Wachstumshemmung gegenüber K, berechnet auf das Gesamtgewicht. Berücksichtigen wir noch, daß am siebenten Tage, von wo Aneurin hier erst wirksam werden konnte, schon etwa die Hälfte des Myzels gebildet worden war, so daß man den Vitamineffekt eigentlich nur auf den restlichen Zuwachs beziehen darf, zeigt sich immerhin noch eine 50prozentige Hemmung.

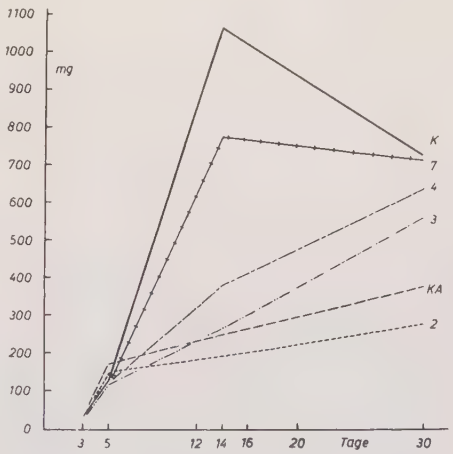



Abb. 5. Wachstum von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ bei Zugabe von 100 $\gamma$ Aneurin/l zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: mg Myzel pro Kolben (Erklärung der Numerierung im Text)

Durch diese Versuchsserie konnte also gezeigt werden, daß Früh- und Spätphase, in denen sich *Fusarium solani* gegenüber Aneuringaben bestimmter Konzentrationen direkt entgegengesetzt verhält, einander anscheinend in keiner Weise bedingen. Durch geeignete Versuchsanordnung können wir am gleichen Objekt demonstrieren:

1. die Frühphase allein, in der Aneurin das Myzelwachstum steigert,
2. die Spätphase allein, in der durch Anwesenheit des Vitamins das Myzelwachstum gebremst wird und
3. Frühphase bis zum sechsten oder siebenten Tage mit Wachstumsförderung durch Aneurin, darauffolgend Spätphase mit Wachstumshemmung.

### 3. Toxinproduktion von *Fusarium solani*

#### a) Bekanntes über die Chemie der Toxine von *Fusarium solani*

Wie bereits ganz zu Anfang erwähnt, wurden sämtliche Versuche zuerst vor allem wegen der interessant erscheinenden Toxinproduktion von *Fusarium solani* unternommen. Der Zusatz von Vitamin zur Nährlösung wurde zu dem Zwecke ausprobiert, um evtl. eine Steigerung der Produktion antibiotisch wirkender Stoffe zu erzielen. Wie aus dem vorhergehenden Abschnitt zu ersehen ist, gestaltete sich der Vitamineinfluß derart vielseitig, daß es im Interesse einer übersichtlichen Darstellung nötig erschien, vor allem Wachstumseffekte und Produktion der Antibiotika scharf zu trennen, obgleich sie an gleichen Versuchen beobachtet wurden. Die Wachstumseffekte wurden deshalb zuerst behandelt, weil an ihnen der ziemlich komplizierte Ablauf eindeutiger zutage trat.

Der toxische Effekt des Kulturfiltrates rührt ganz sicher nicht von einer einheitlichen Substanz her. RUELIUS und GAUHE, die sich eingehend mit der Chemie der Ausscheidungsprodukte von *Fusarium solani* befaßten, arbeiteten glücklicherweise ebenfalls mit einer Reinkultur aus Baarn. Die für uns sehr interessanten Ergebnisse wurden in zwei Artikeln veröffentlicht (18, 19).

An Hand von gereinigten kristallinen Produkten konnten sie zeigen, daß es sich bei der je nach pH rot bis violett gefärbten antibakteriell wirksamen Komponente um ein Naphtochinon der Bruttoformel $C_{15}H_{14}O_7$ handelte, welches sie Fusarubin nannten.

Schon 1942 beobachteten WILKINS und HARRIS (30) ein solches Antibiotikum bei *Fusarium javanicum*. ARNSTEIN, COOK und LACEY (2, 3) nahmen weitere Untersuchungen mit diesem Pilz auf. Von ARNSTEIN und COOK (1) stammt dann eine Arbeit über die chemische Reinigung des Pigmentes, das sie kristallin erhielten. Sie gaben der Substanz den Namen Javanicin. Im Kulturfiltrat wurde es zusammen mit seiner Oxyverbindung, dem Oxyjavanicin, gefunden und bei den meisten von BARON in seinem Handbuch der Antibiotika (4) angegebenen Extraktionsmethoden mit ihm zusammen isoliert.

Beim Vergleich von gereinigtem Fusarubin mit Oxyjavanicin von Cook zeigte sich, daß beide Substanzen wahrscheinlich identisch sind. Trotzdem wurde die Bezeichnung Fusarubin in den Arbeiten von Ruelius und Gauhe auch weiterhin beibehalten.

Die Verbindung gibt sehr leicht ein tiefrot gefärbtes, sehr schwer lösliches Anhydroderivat. Auch Fusarubin bzw. Oxyjavanicin ist nicht gut wasserlöslich. Da aber aus dem Myzel von *Fusarium solani* bei Extraktionsversuchen von Herrn Dr. Boller, einem Mitarbeiter am Instiut von Prof. Ruzicka, dem wir an dieser Stelle für seine wertvolle Mitarbeit danken wollen, keine nennenswerten Mengen von Pigment isoliert werden konnten, mußte angenommen werden, daß bei der Kultur auf Raulin- und Richardlösung (Ruelius und Gauhe benutzten eine andere) fast die gesamte Menge ins Kulturfiltrat ausgeschieden wurde. Dies deutete darauf hin, daß die antibakteriell wirksamen Stoffe ursprünglich nicht in ausgesprochen schwer wasserlöslicher Form vorliegen konnten, denn aus den Untersuchungen z. B. über Enniatin (15) geht hervor, daß solche Stoffe mit Vorliebe im Myzel verbleiben, da sie auch beim Absterben der Zellen viel schwerer ausgelaugt werden. Tatsächlich fanden Ruelius und Gauhe bei näherer Untersuchung, daß sich Fusarubin im Kulturfiltrat etwa zur Hälfte an einen wasserlöslich machenden Rest gebunden vorfand, der die Zusammensetzung $-SO_3NH_4$ hatte. Das freie Fusarubin-schwefelsaure Ammonium, von den Autoren Fusarubinogen genannt, war in Lösung gelb gefärbt und schied sich aus konzentrierten wäßrigen Lösungen in Form orangefarbener Nadeln oder Rhomben ab. In Lösung war es unbeständig. Der Zerfall in Fusarubin, $H_2SO_4$ und $NH_4OH$ begann bereits, wenn man z. B. mit verdünnter HCl stärker sauer machte als pH 5,5.

Bei unseren Versuchen wurde beobachtet, daß die Kulturfiltrate sich besonders bei Züchtung auf Richard$_1$ zu Anfang, wenn bereits eine meßbare Aktivität der Nährlösung konstatiert werden konnte, gelb färbten. Erst nachträglich trat ein Umschlag nach rot ein. Es ist also sehr wohl möglich, daß ursprünglich der gesamte Farbstoff in der gut wasserlöslichen Form vorlag und erst durch nachträgliche Aufspaltung in der Nährlösung ein Teil als Fusarubin bzw. Oxyjavanicin frei wurde, wodurch das Kulturfiltrat die typische rote Farbe erhielt.

Leider findet sich bei Ruelius und Gauhe kein Hinweis, ob die leichter lösliche Form auch eine stärkere Giftwirkung auf Bakterien ausübt oder ob diese durch die Veresterung abgeschwächt wird. Es wäre interessant, das zu untersuchen.

Durch die Anwendung verschieden zusammengesetzter Kulturmedien wird der Stoffwechsel von *Fusarium solani* zuweilen stark verändert. Es zeigen sich z. B. große Unterschiede im pH-Verlauf, je nachdem, ob auf Raulin oder auf Richard kultiviert wird. Das wird einen Einfluß darauf haben, wie stark im Laufe der Zeit der Anteil von Oxyjavanicin und seinem Anhydrid neben dem wasserlöslichen, aber nicht sehr beständigen Ester ansteigt. Außerdem wissen wir nicht, ob die Stoffe der Javanicin-Gruppe die einzigen Verbindungen mit antibiotischen Eigenschaften sind, die der Pilz

unter den hier beschriebenen Umständen produziert. Auf Grund der ausgesprochenen Färbung sind sie die auffallendsten, neben ihnen könnten aber ganz gut noch andere Toxine eine Rolle spielen.

Wird nun durch Aneurinzusatz eine Veränderung der Stoffwechselvorgänge bei *Fusarium solani* verursacht, so kann es sehr wohl wieder zu mengenmäßigen Verschiebungen der Anteile der verschiedenen Komponenten im Kulturfiltrat kommen, und wenn wir mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen können, daß die Giftwirkung nicht bei allen genau gleichgroß ist, läßt sich leicht verstehen, daß wir bei Veränderungen der Toxizitätskurven verwickeltere Verhältnisse antreffen werden, als dies bei den Veränderungen der Wachstumskurven der Fall war.

b) Testmethode

aa) Technische Durchführung

Bei den Toxinen im Kulturfiltrat von *Fusarium solani* handelt es sich um sogenannte Antibiotika, d. h. biogene Stoffe, die in kleinen Mengen gewisse Bakterien am Wachstum oder am Weiterleben überhaupt verhindern können. Auf dieser Eigenschaft beruht die Technik des Bakterientestes, die von der Arbeitsgemeinschaft für Antibiotika am Institut für spezielle Botanik an der Eidg. Technischen Hochschule übernommen werden konnte (8, 10).

Der Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Difco-Bouillon, zu 1 ccm in mit Wattebäuschen verschlossene Reagensröhrchen abgefüllt, wurde im Autoklaven bei 110 bis 120° C sterilisiert. Mit einer sterilen 1-ccm-Pipette entnahm man dem zu untersuchenden Kulturfiltrat 1 ccm Flüssigkeit und stellte eine Verdünnungsreihe mit folgenden Stufen her: $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$ ... usw. der ursprünglichen Konzentration. Da eine hohe Konzentration der ersten Stufe immer besonders stark auf Kosten des eigentlichen Bakteriennährmediums, der Bouillon, gehen muß, ist wohl die Mischung $^1/_2$ Bouillon + $^1/_2$ Kulturfiltrat die obere Grenze für ein zuverlässiges Wachstum der Testorganismen. Es wurde jeweils so weit verdünnt, bis man sicher war, daß mindestens im letzten Röhrchen das Bakterium einwandfrei wuchs, d. h. genau so stark wie im Röhrchen mit reiner Bouillon, daß man also sicher einen Endpunkt der Toxizität feststellen konnte.

In Vorversuchen wurde eine Reihe von Bakterien auf ihre Sensibilität gegenüber *Fusarium*-Kulturfiltrat untersucht:

Gute Sensibilität zeigten:

*Bacillus mesentericus* Trevisan (E. T. H. 320)
*Bacterium mycoides* Typisch (E. T. H. 346)
„ *circulans* (E. T. H. 2002)
„ *subtilis* (E. T. H. 2016)
*Staph. aureus* (E. T. H. 2026, ATCC 6538. P).

Schwache Sensibilität zeigten:

*Bacterium megatherium* De Bary (E. T. H. 321)
*Sarcina lutea* II (E. T. H. 342)
*Mycobact. phlei* (E. T. H. 2025, ATCC).

Von diesen Bakterien wurde *Bacterium mycoides*, das uns freundlicherweise vom Hygiene-Institut der Universität Zürich zur Verfügung gestellt worden war, für die weiteren Versuche ausgewählt. Es zeigte zwar nicht die größte Sensibilität, hatte dagegen einen sehr scharfen Endpunkt der Wachstumshemmung im Bouillontest. Dadurch wurde eine relativ gute Sicherheit in bezug auf das Ablesen der Testresultate gewährleistet. Eine Stammkultur dieses Bakteriums, die über Nacht in 4 ccm Difco-Bouillon bei 33 ° C gewachsen war, wurde nun mit steriler Bouillon auf die Hälfte verdünnt. Dann wurde jedes Teströhrchen mit einem Tropfen dieser Bakterienaufschwemmung beimpft, worauf man alles zusammen etwa 18 Stunden in einen Thermostaten von 33 ° C stellte.

Bei der Zubereitung der Stammkulturen mußte darauf geachtet werden, daß diese nicht direkt von Agarkulturen beimpft wurden, sondern daß das Bakterium mindestens ein bis zwei Passagen durch Bouillon hinter sich hatte. Sonst waren die Schwankungen in der Sensibilität gegenüber den *Fusarium*-Toxinen übermäßig groß. Dagegen durfte man auch nicht allzu oft von Bouillon auf Bouillon impfen, da sonst zeitweise fast gar keine Empfindlichkeit mehr bestand. Man mußte also auf jeden Fall alle zwei Wochen wieder auf Agarkulturen zurückgreifen.

Wenn beim Aufsaugen der Kulturflüssigkeit störende Myzelfetzen mitkamen, die in der Bouillon rasch weiterwuchsen und die Beurteilung der Bakterientrübung unmöglich machten, filtrierte man am besten gleich beim Aufsaugen, indem man mit einer abgeglühten Pinzette etwas sterile Watte vorn in die Pipette stopfte.

#### bb) Beurteilung der Resultate

Die Resultate wurden nach Verdünnungsstufen abgelesen. Dabei entsprach Stufe 1 einer Verdünnung $^1/_2$, Stufe 2 einer solchen von $^1/_4$ usw. War das Röhrchen z. B. mit Verdünnung $^1/_8$ gerade noch klar, das folgende gleich trüb wie die Kontrolle in reiner Bouillon, dann hieß das, die Aktivität des Kulturfiltrates ging bis Stufe 3. War das nächstfolgende nur halb oder noch schwächer getrübt und das Bakterienwachstum erst im übernächsten Röhrchen normal, dann hieß es, die Aktivität ging bis Stufe 3,5 resp. 3,25. Diese Zwischenwerte wurden geschätzt.

Als Einheiten wurden die jeweiligen Nenner der letzten, noch ganz klaren Verdünnung gewählt. Hemmungen z. B. bis Stufe 3, d. h. auf $^1/_8$ verdünnt, bedeutete, daß in 1 ccm Kulturfiltrat acht Einheiten gemessen wurden. Zwischenwerte wurden logarithmisch berechnet.

Wies also ein Kulturfiltrat Nr. 1 eine Hemmung bis Stufe 2 auf, ein anderes Nr. 2 eine solche bis Stufe 4, so zeigte Nr. 2 die vierfache Toxinwirkung wie Nr. 1.

#### cc) Der Standard

Die auf oben beschriebene Weise gefundenen Resultate waren im allgemeinen nicht ohne Korrektur zur Aufstellung von Aktivitätskurven brauchbar, besonders, wenn sich die Versuche über mehrere Wochen erstreckten. Schon die Nährlösungen waren immer unkontrollierbaren Schwankungen

unterworfen. Besonders mußte man aber mit Verschiedenheiten der Sensibilität des Bakteriums rechnen, das ja praktisch alle ein bis zwei Wochen neu abgeimpft wurde. Daher mußte man eine Bezugsbasis in Form einer Lösung haben, deren Toxinkonzentration immer gleich hoch war. Zeigten dann diese Teste an verschiedenen Tagen nicht die gleichen Werte, so konnte es sich nur um eine Verschiebung der Bakterienreaktion handeln, die man dann auf einen vorher festgesetzten Wert umrechnen konnte. Entsprechende Korrekturen wurden jeweils mit den Kulturfiltrat-Testen, die mit gleichem Bakterienmaterial beimpft waren, vorgenommen.

Wo dies möglich ist, wird man den Standard aus einer Lösung von reinem, kristallinem und abwägbarem Toxin herstellen, so daß man zum Schluß von den Einheiten aus direkt die Menge der anwesenden Toxine errechnen kann. In unserem Fall war das nicht möglich, weil sich das Anhydrid, das wir bei der chemischen Aufarbeitung erhielten, nicht mehr in Wasser löste.

Es hatte sich aber gezeigt, daß die Aktivität im Kulturfiltrat konstant blieb, wenn man dies vom Pilzmyzel befreite und im Kühlraum aufbewahrte. So wurden etwa 300 ccm sehr aktive Lösung einer Raulin-Kultur durch Seitz-Filtration kalt sterilisiert und bei 4 bis 6° C aufbewahrt. Je 1 ccm davon wurde mit jeder neuen Testserie mitgemessen. Nach etwa drei bis vier Monaten begann sich auch hier ein feiner Bodensatz zu bilden, der, nach seiner dunkelroten Farbe zu schließen, vor allem aus einer Javanicin-ähnlichen Komponente bestand, und gleichzeitig nahm die Aktivität der Lösung ab. Durch Schütteln vor der Flüssigkeitsentnahme verteilte sich der Satz wieder gleichmäßig und löste sich in der Bouillon vollständig. Auf diese Weise blieb die Aktivität/ccm immer gleich hoch.

### c) Toxinproduktion ohne Aneurin in der Nährlösung

#### aa) Temperatur-Zeitversuch auf Richard$_4$

Der Versuch wurde in Glaxo-Kolben ausgeführt, oben und unten flachen, runden Glasgefäßen mit einem Durchmesser von 18 cm. Der Ausgang besteht aus einem seitlichen, schräg nach oben weisenden Glasrohr, so daß man die Kolben gut aufeinander stapeln kann und in der Lage ist, dem Kulturfiltrat Proben zu entnehmen, ohne sie zu kippen. Die Gefäße wurden mit je 500 ccm Nährlösung beschickt und mit 5—6 000 000 Konidien einer Richard$_4$-Kultur von *Fusarium solani* beimpft. In Thermostaten von 6 bis 37° C (Temperaturdifferenz von Stufe zu Stufe 3° C) wurden sechs bis sieben Kolben untergebracht, so daß der Pilz im Dunkel wuchs. Man mußte darauf achten, daß die Gefäße zumindest während der ersten 14 Tage nicht verschoben wurden, da sonst die normale Entwicklung der Oberflächenmyzelien leicht gestört wurde und entsprechend die Toxizität des betreffenden Kulturfiltrates ganz veränderte Werte zeigte.

Für die Aktivitätsmessung wurde mit einer sterilen Pipette jedem Kolben 1 ccm Lösung entnommen und in der oben beschriebenen Weise getestet. Bald mußte jedoch wegen des großen Arbeitsaufwandes die Methode etwas vereinfacht werden.

*Tabelle 3*

Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ bei Temperaturen von 6 bis 37° C in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer (Angabe der Aktivitätsstufen)

| Alter in Tagen ..... | | 4 | 6 | 9 | 11 | 13 | 16 | 18 | 20 | 23 | 27 | 32 | 37 | 40 | 46 | 50 | 53 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Temperatur | 37° C | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | — | — | — | — | — | — | — | | - |
| | 33 | 0 | Spur | 0,21 | 0,27 | 0,79 | 1,00 | 0,42 | — | 0,50 | — | 0,58 | — | — | — | | - |
| | 30 | Spur | 1,04 | 0,82 | 1,21 | 1,83 | 1,71 | 1,61 | 1,25 | 1,46 | 1,25 | 1,35 | 1,25 | — | — | | - |
| | 27 | 0 | 1,00 | 1,13 | 1,33 | 2,00 | 2,60 | 2,42 | 2,54 | 2,46 | 2,17 | 1,90 | 1,85 | | | | |
| | 24 | 0,44 | 1,13 | 0,96 | 1,33 | 2,04 | 2,70 | 2,63 | 3,08 | 2,79 | 2,42 | 3,00 | 3,00 | — | — | — | — |
| | 21 | Spur | 0,96 | 0,67 | 1,83 | 1,67 | 1,97 | 2,17 | 2,17 | 2,08 | 1,75 | 2,00 | 2,00 | — | — | — | |
| | 18 | 0 | 0 | 0,54 | 1,17 | 1,33 | 2,20 | 2,42 | 2,88 | 2,58 | 2,08 | 2,57 | 3,00 | 3,75 | 3,75 | 4,15 | 3,35 |
| | 15 | 0 | 0 | Spur | 1,21 | 1,42 | 2,88 | 3,67 | 4,17 | 4,10 | 3,92 | 3,75 | 4,00 | 3,83 | 3,85 | 4,25 | 4,15 |
| | 12 | — | — | 0 | 0 | 0 | 2,00 | | | | | (Störung) | | | | | |
| | 9 | — | — | — | — | — | 0,55 | 0,45 | 1,15 | 1,05 | 1,00 | 1,85 | 2,75 | 2,33 | 2,75 | 2,40 | 2,35 |
| | 6 | — | — | — | — | — | — | 0 | — | 0 | — | — | 0 | — | — | — | — |

*Tabelle 4*

Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Raulin$_4$ bei Temperaturen von 6 bis 37° C in Abhängigkeit von der Wachstumsdauer (Angabe der Aktivitätsstufen)

| Alter in Tagen ..... | | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 13 | 16 | 18 | 20 | 23 | 25 | 27 | 30 | 33 | 35 | 39 | 44 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Temperatur | 37° C | 0,75 | 1,15 | 1,50 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| | 33 | 0,75 | 1,85 | 2,50 | 3,85 | 3,85 | 3,50 | 3,25 | 3,50 | 3,50 | — | — | — | — | — | | - | |
| | 30 | 0,75 | 3,00 | 3,50 | 4,35 | 5,25 | 5,65 | 5,40 | 5,25 | 5,00 | — | — | — | — | — | — | | |
| | 27 | 0,75 | 3,35 | 3,50 | 5,00 | 6,00 | 6,60 | 6,25 | 6,50 | 6,25 | — | — | — | — | — | — | | — |
| | 24 | 1,35 | 4,00 | 4,75 | 5,85 | 6,15 | 6,75 | 7,25 | 7,10 | 6,85 | 7,10 | 6,75 | — | — | | | — | |
| | 21 | 0,75 | 2,10 | 4,50 | 4,85 | 5,00 | 5,85 | 6,60 | 7,00 | 7,15 | 6,90 | 6,90 | 7,00 | 7,35 | 7,65 | 7,30 | 7,20 | 7,25 |
| | 18 | 0,75 | 1,15 | 2,50 | 5,00 | 5,10 | 5,60 | 5,75 | 6,25 | 6,65 | 6,60 | 6,35 | 7,00 | 7,45 | 6,75 | 7,60 | 6,90 | 6,90 |
| | 15 | 0,75 | 1,15 | 1,75 | 4,10 | 5,00 | 5,50 | 6,00 | 6,10 | 6,35 | 6,25 | 6,50 | 6,40 | 6,75 | 6,60 | 7,20 | 7,20 | 7,20 |
| | 12 | — | 1,00 | 1,25 | 1,40 | 1,65 | 2,50 | 5,00 | 5,10 | 5,50 | 5,65 | 5,10 | 5,75 | 5,75 | 6,50 | 7,10 | 6,80 | 7,00 |
| | 9 | — | 1,00 | 1,25 | 1,25 | — | 1,50 | 1,75 | — | 1,75 | — | 3,50 | — | 4,75 | — | 5,05 | 5,30 | 4,00 |
| | 6 | — | — | 1,25 | 1,25 | — | — | 1,25 | — | 1,00 | — | — | — | 1,25 | — | — | — | — |

Die Proben aller Kolben in einem Thermostaten wurden zu gleichen Teilen gemischt und davon drei Paralleltests mit je 1 ccm gemacht. Eigentlich war auf diese Weise die Messung sogar genauer, da auch noch die Streuung von *Bacterium mycoides* mit einkalkuliert werden konnte. Jeder Kurvenpunkt stellte nun den Durchschnitt aus drei Paralleltesten mit der Kulturfiltratmischung der jeweiligen Temperatur dar.

Daß die Messungen trotz aller dieser Maßnahmen große Unregelmäßigkeiten zeigten, ist sehr bedauerlich. Da sich aber die charakteristischen Merkmale bereits in einem anderen, kleiner angelegten Versuch auf gleicher Nährlösung deutlich gezeigt hatten, seien die Resultate hier ebenfalls angeführt (Tab. 3). (Siehe auch diesbezügliche Kurve bei GÄUMANN, Pflanzliche Infektionslehre, 2. erweiterte Auflage, S. 319.)

Zwischen 30 und 50 ° C war auf jeden Fall die Tendenz ausgeprägt, daß mit abnehmender Temperatur die Aktivitätsmaxima immer später erreicht wurden (bei 30 ° am 13. Tage, bei 18 ° erst am 50.!), daß aber die Konzentration der Toxine eine wesentlich höhere wurde, wenn dem Pilz bei tieferer Temperatur längere Zeit zur Entwicklung gelassen wurde. Ein Maximum von 3,6 Einheiten bei 30 ° C stand einem solchen von 18 Einheiten bei 18 ° gegenüber.

33 ° C war auf diesem Nährsubstrat bereits zu hoch für den Pilz. Die Toxinproduktion erschien verzögert gegenüber der 30 °-Kurve, und bei 37 ° war trotz mittleren Myzelwachstums keine toxische Wirkung des Kulturfiltrates auf *Bacterium mycoides* mehr festzustellen.

Wahrscheinlich unterschieden sich die Stoffwechselprodukte bei sehr verschiedenen Temperaturen nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ. Als Hinweis hierzu mußte die Erscheinung gewertet werden, daß oberhalb 20 bis 21 ° C nach 18tägiger Wachstumsdauer ein deutliches Opalisieren des Kulturfiltrates auftrat, welches von 18 ° abwärts auch nach mehrwöchiger Versuchsdauer nie zu beobachten war.

Im pH-Verlauf ergaben sich zeitmäßig ebenfalls Unterschiede. Bei 18 ° C folgte nach der Beimpfung bei pH 4,6 ein Absinken während einiger Zeit bis etwa pH 3,9 am elften Tage. Darauf setzte ein allmählicher Anstieg ein, bis pH 5,8 bis 6,0 nach 50 Tagen, also zur Zeit des Aktivitätsmaximums. Nachher traten keine wesentlichen Veränderungen mehr auf. Bei 33 ° C, der maximalen Temperatur für meßbare Toxinkonzentrationen in der Nährlösung, war der pH-Abfall zu Beginn des Wachstums schwächer, der Anstieg rascher und das pH bei Abbruch des Versuches auf 6,4. Die 9 °-Kolben erreichten pH 4,1, ihren niedrigsten Wert, erst nach etwa dreiwöchiger Versuchsdauer. Ein merklicher Anstieg blieb dann ganz aus.

Alterung und Schrumpfung der Kulturen setzte bei Temperaturen über 20 ° C schneller ein als bei 18 ° und darunter. Es hatte daher keinen Wert, die Aktivitäten bei allen Temperaturen gleich lange zu verfolgen.

All diese Merkmale: rascherer Abschluß des Wachstums, beschleunigter Verlauf der pH-Veränderungen, früheres Erreichen des Aktivitätsmaximums bei hohen Temperaturen lassen die Wirksamkeit der allgemeinen chemischen Regel von VAN T'HOFF erkennen, daß endotherme Reaktionen

durch Erhöhung der Außentemperatur beschleunigt werden. In gewissen Grenzen ist das natürlich auch für einen Pilzorganismus gültig, so daß sein Stoffwechsel im großen und ganzen bei höheren Temperaturen rascher funktioniert. Da wir aber bei Anwendung der chemischen Regel auch die Ausscheidungsprodukte mit einbeziehen müssen, von denen uns in diesem Fall einige auf Grund ihrer toxischen Wirksamkeit gegen Bakterien von besonderem Interesse sind, müssen wir bei der Betrachtung der gemessenen Konzentrationen noch eine weitere Überlegung anschließen: Wohl scheint es so, daß *Fusarium solani* seinen Stoffwechsel bei höheren Temperaturen derart umstellt, daß wirklich weniger an toxischen Stoffen gebildet wird. Es ist aber möglich, daß die geringeren Wirksamkeiten der betreffenden Kulturfiltrate durch eine bei hohen Temperaturen stärker und rascher wirkende Desaktivierung der Toxine nach der Ausscheidung in die Kulturlösung verschuldet wird, so daß wir nicht eine entsprechende Anreicherung wie bei tieferen Temperaturen feststellen können.

#### bb) Temperatur-Zeitkurven auf Raulin$_4$

Ein analoger Versuch, wie im vorigen Abschnitt besprochen wurde, diesmal aber auf Raulin$_4$, führte zu ähnlichen Ergebnissen. Versuchsanordnung und Technik der Aktivitätsbestimmung waren genau gleich.

Bei Betrachtung der Kurvenschar (s. auch Tab. 4) fällt als erstes ins Auge, daß auf Raulin$_4$ die Toxinproduktion viel höher war als auf Richard$_4$. Trotz nur etwa halb so guten Wachstums der Myzelien betrugen die höchsten Toxinwirkungen das zehnfache.

Die Tendenz, mit abnehmender Temperatur später erscheinende, aber höhere Maxima zu erreichen, war hier noch deutlicher ausgeprägt als beim vorigen Versuch.

Die Verträglichkeit für hohe Temperaturen war etwas besser: sogar bei 37° C wurden noch geringe Aktivitäten gemessen. Auch erschien bei dieser Temperatur das Maximum nicht verzögert, sondern am frühesten von allen, bereits am siebenten Tage.

Um eine gute Übersicht zu gewinnen, teilt man die Kurvenschar am besten in drei Gruppen ein:

1. Von 37 bis 24° C. Die Maxima erschienen zwischen dem 7. und 16. Tag. Der Aktivitätsanstieg mit abnehmender Temperatur betrug zwischen 37 und 33° über das vierfache und nahm bei den folgenden Stufen kontinuierlich ab. (Es werden hier immer die Maxima der Temperaturkurven miteinander verglichen.)
2. Von 21 bis 12° C. Die Maxima erschienen vom 33. bis 44. Tag. Ihre Höhe war nahezu gleich.
3. Bei 9° C. Das Maximum erschien gleichzeitig mit dem von Gruppe 2, lag jedoch tiefer. Die Toxinwirkung betrug nur ungefähr 1/2 bis 1/4 der dort beobachteten Werte.

Eine geringe Aktivität trat sogar noch bei 6° C auf, wo das Wachstum nur ganz schwach war; sie blieb aber während des ganzen Versuches praktisch auf gleicher Höhe.

Die pH-Veränderung auf Raulin ist einfach: Anfänglich 4,4, sinkt das pH bei 18 ° C nach elf Tagen bis auf 2,9. So verbleibt es, obgleich die Aktivitätskurve noch lange Zeit ansteigt. Temperaturen unter 18 ° verlangsamen das Absinken, über 18 ° beschleunigen es bis zum Optimum bei 24 °. Ab 27 bis 37 ° tritt dann wieder deutliche Verzögerung ein, und bei 33 und 37 ° ist außerdem noch insofern eine Änderung zu verzeichnen, als das pH überhaupt nur noch wenig unter 3,5 absinkt. Bei diesen Temperaturen scheint die Produktion von organischen Säuren durch *Fusarium solani* gehemmt.

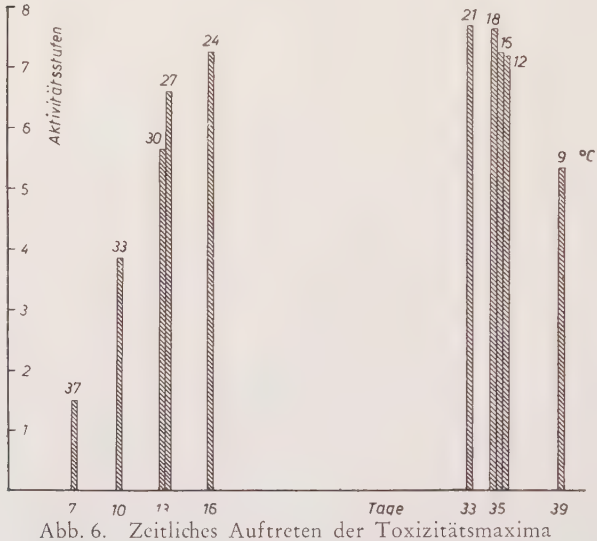


Abb. 6. Zeitliches Auftreten der Toxizitätsmaxima von *Fusarium solani* bei Kultur auf Raulin$_4$. Wachstumstemperaturen von 9 bis 37 ° C. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Aktivitätsstufen

Die Verfolgung der Kurven von 24 ° C an aufwärts wurde abgebrochen, als das Myzel schon so stark gealtert war, daß die Oberflächenkulturen in die Nährlösung absanken.

Neue Schlüsse waren aus diesen Resultaten nicht zu ziehen: Obgleich der Pilz sich auf Richard und Raulin morphologisch ganz verschieden verhielt, waren seine Reaktionen in bezug auf Toxinproduktion bei verschiedenen Temperaturen fast gleich. Die Resultate des einen Versuches dienten zur Bekräftigung des anderen.

### d) Auswirkung von Aneurin in der Nährlösung auf die Toxinproduktion

#### aa) Toxinproduktion auf Richard$_4$ + Aneurin

Da die Toxinbildung auf Richard-Lösung oft nicht ganz befriedigend erschien, wurde ausprobiert, ob durch Vitaminzusätze zum Substrat von *Fusarium solani* der Pilz eventuell zu erhöhter Produktion angeregt werden könnte. Vor allem lag die Überlegung zugrunde, daß er auch im Boden und auf den Pflanzen, die er zwar vorwiegend saprophytisch besiedelt, gewisse Vitamine vorfindet.

Die Tatsache, daß das Wachstum, wie bereits besprochen, in ganz auffälliger Weise durch Aneurin beeinflußt werden kann, war eine Überraschung. Sie war um so willkommener, als die ersten Bakterienteste des Vorversuches keinen sichtlichen Einfluß des Vitamins auf die Aktivität des Kulturfiltrates vermuten ließen: Die Toxinkonzentration in den Aneurinkolben war annähernd gleich hoch wie in den Kontrollen. Als dann aber die Myzelgewichte

mit zur Auswertung der Resultate herangezogen wurden, zeigte sich, daß pro Gramm Myzel im Vitaminversuch eine deutlich stärkere Aktivität erzielt worden war.

In den folgenden Großversuchen konnte diese Erscheinung bestätigt und bestärkt werden. Genau wie Aneurin das Wachstum beeinflußte, gleichgültig, ob es sich um altes oder frisches Impfmaterial handelte, so war es auch bei der Stimulation der Toxinbildung. Die Aktivität wurde meistens durch Aneurin so stark gefördert, daß schon die direkte Messung des Kulturfiltrates ohne Umrechnung auf das Myzelgewicht weit höhere Werte ergab als die Kontrolle.

Ob es sich um eine einfache Intensivierung handelte, so daß nur eine vermehrte Produktion der gleichen Giftstoffe wie in den Kontrollen eintrat, oder ob der Pilz durch das Vitamin derart beeinflußt wurde, daß er zusätzlich andere Stoffe mit antibiotischer Wirkung produzierte, konnte nicht untersucht werden.

Der pH-Verlauf war entsprechend dem langsameren Wachstum verschoben, im ganzen aber ähnlich wie auf Richard$_4$ ohne Aneurin.

**bb) Einfluß verschiedener Aneurinkonzentrationen in Richard$_4$ auf die Toxinproduktion**

Die Beeinflussung der Toxinproduktion durch abgestufte Aneuringaben verlief nicht ganz entsprechend den Erscheinungen beim Myzelwachstum.

Betrug die Menge Aneurin 25 bis 800 $\gamma$/l, so fanden wir maximale Hemmung des Wachstums in der Altersphase ohne Unterschiede im Wirkungsgrad. Auch im Hinblick auf die Toxizität bildeten die Reihen mit diesen Konzentrationen eine Gruppe mit gleichem Aktivitätsverlauf. Die Steigerung gegenüber der Kontrolle war bereits ohne Umrechnung auf das Trockengewicht beträchtlich. Das Maximum erschien durch den verzögernden Einfluß des Vitamins 5 Tage später.

Interessante Ergebnisse lieferte die zweite Versuchsserie mit den Aneurinkonzentrationen 0,01 bis 1000 $\gamma$/l (Abb. 8).

Bei einer Gabe von 1 $\gamma$/l, die wir als Übergangskonzentration mit suboptimaler Wirkung auf das Wachstum kennenlernten, war auch hier ein außerordentlicher Effekt zu beobachten: Die Steigerung der Aktivität des Kulturfiltrates war weitaus am größten von allen Reihen.

Man kann sich das so erklären, daß die Erhöhung der Toxinproduktion auch noch durch 1 $\gamma$ Aneurin/Liter in vollem Maße stattfand. Entsprechend dem reichlicher gebildeten

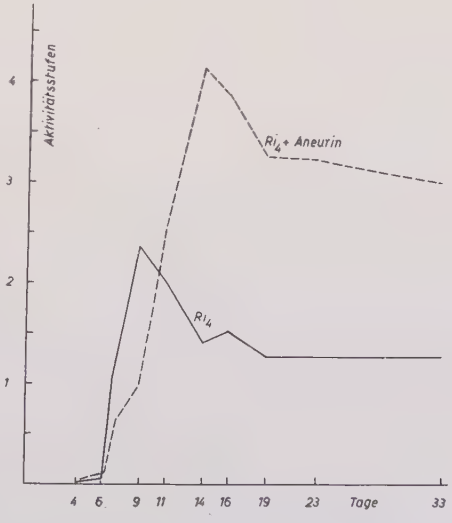



Abb. 7. Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ + Aneurin in Konzentrationen von 50 bis 800 $\gamma$/l. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Aktivitätsstufen

Myzel gegenüber den maximal gehemmten Reihen war daher die Giftkonzentration im Kulturfiltrat höher. (Siehe auch Toxizitätssteigerung, berechnet pro Gramm Myzel, S. 331.)

Konzentrationen von 0,1 $\gamma$ abwärts hatten, genau wie auf das Wachstum, keinen Einfluß mehr.

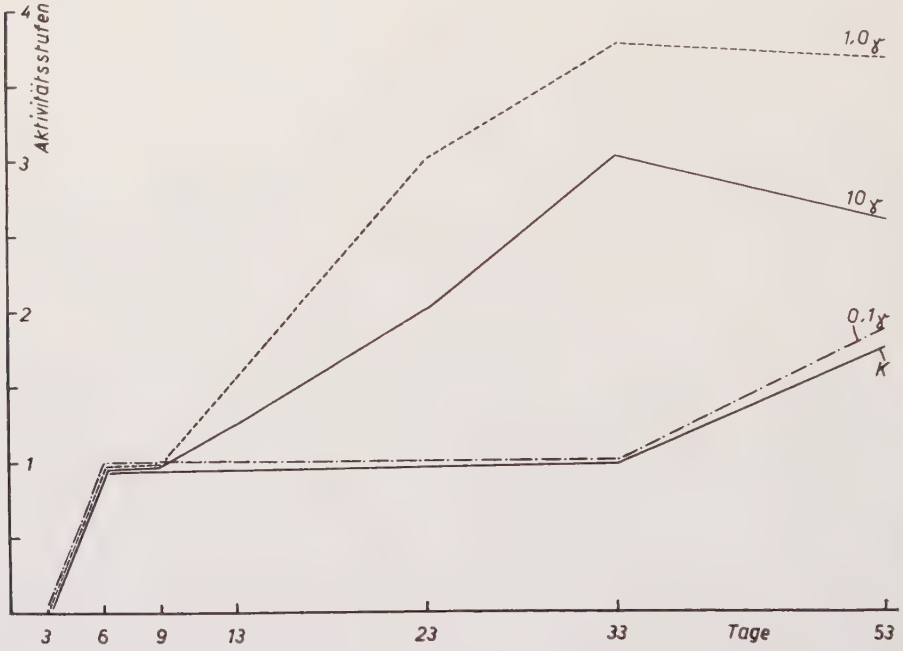



Abb. 8. Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ + Aneurin in Konzentrationen von 0,01 bis 1000 $\gamma$/l. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Aktivitätsstufen

Bei der Betrachtung der Aktivitätskurven zeigt sich also wieder die gleiche Gruppierung, wie wir sie bereits für die Wachstumskurven aufgestellt hatten. Nur haben sich hier die Wirkungsgrade verschoben:

1. Bei kleinen Vitaminkonzentrationen (unter 0,1 $\gamma$/l) bestand keine Wirkung auf die Toxinproduktion (gleich wie beim Wachstum).
2. Bei hoher Vitaminkonzentration (über 10 $\gamma$/l) mittlerer Effekt auf die Toxinproduktion (beim Wachstum größter Effekt).
3. Bei Konzentrationen von etwa 1,0 $\gamma$/l maximaler Effekt, da die Anregung des Myzels noch gleich stark war wie bei Gruppe 2 (Wachstumshemmung war dagegen schwächer).

#### cc) Einfluß von Aneurin in Raulin$_4$ auf die Toxinproduktion

Bei Zusatz von Aneurin zu Raulin$_4$ wurden von den Aktivitäten nur Stichproben gemacht: Am fünften Tage zeigten Aneurinreihe und Kontrolle bereits die beachtliche Aktivität bis Stufe 2, am zehnten Tage beide bis Stufe 6.

Genau wie in bezug auf den Myzelzuwachs fehlte also auch hier eine Beeinflussung der Toxinproduktion durch Aneurin.

#### dd) Einfluß von Aneurin in Richard$_4$ + $ZnSO_4$ auf die Toxinproduktion

Es handelt sich um den gleichen Versuch wie bei der vorausgegangenen Besprechung des Aneurineinflusses auf das Myzelwachstum Seite 314. (Die Motivierung des Zusatzes von $ZnSO_4$ siehe dort.)

Bei Anwesenheit von $ZnSO_4$ (50 mg/l) in der sonst unveränderten Richard-Lösung büßte Aneurin seine aktivitätssteigernde oder irgendeine die Toxinproduktion verändernde Wirkung ein.

Das Zink steigerte mit und ohne Aneurin die Aktivität des Kulturfiltrates in ganz gleicher Weise, so daß beide Kurven praktisch parallel verlaufen. Bei den zwei Kontrollserien dagegen, Richard$_4$ mit und ohne Aneurin, kann man wieder deutlich den Einfluß des Vitamins ablesen.

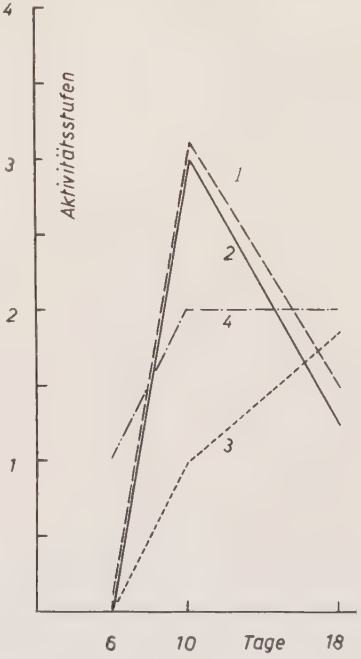



Abb. 9. Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ + $ZnSO_4$ (1), Richard$_4$ + $ZnSO_4$ + Aneurin (2), Richard$_4$ (3) und Richard$_4$ + Aneurin (4). Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Aktivitätsstufen

Aus den Myzelgewichtsmessungen war zu ersehen, daß durch $ZnSO_4$ nur die Wachstumshemmung der Spätphase aufgehoben wurde, daß Aneurin seine wachstumsfördernde Wirkung während der Frühphase dagegen voll ausüben konnte. Da meßbare Toxinkonzentrationen aber überhaupt erst während der Spätphase auftraten, schien bei alleiniger Betrachtung der Aktivitätskurven der Aneurineffekt vollständig ausgelöscht zu sein. (Das gleiche gilt auch für den vorhergehenden Versuch auf Raulin.)

#### ee) Diskussion

Es stellt sich die Frage, wie man sich den Wirkungsmechanismus Zink—Aneurin vorzustellen hat.

Eine direkte Beeinflussung des Vitamins durch das Spurenelement über irgendwelche direkte chemische Reaktionen, eventuell bereits in der Nährlösung, so daß Aneurin in verändertem, desaktiviertem Zustand von dem Myzel aufgenommen wird, halte ich für ausgeschlossen. Dagegen spricht die volle Wirksamkeit während der Frühphase selbst bei Anwesenheit großer Überschüsse von $ZnSO_4$.

Wie aus Tabelle 2 (S. 315) ersichtlich ist, wurde das pH durch das zusätzliche Spurenelement stark herabgedrückt, und es fragt sich, ob man hier einfach eine Säurewirkung des Nährmediums auf das Aneurin annehmen kann, wobei dies durch ungünstige pH-Verhältnisse im Substrat nicht zur Wirkung kommen konnte. Die pH-Verschiebung geschah aber allmählich, und am vierten Tage, als wir an den Myzelgewichten bereits einen deutlichen Ein-

fluß des Zinks ablesen konnten, betrugen die pH-Differenzen zwischen Kontrolle und Richard$_4$ + 10 oder 2,5 mg $ZnSO_4$/l erst 0,1 bis 0,2 Einheiten. Zuerst wurde also durch das Spurenelement das Wachstum beschleunigt, und zwar unabhängig vom Aneurineffekt, so daß dieser bereits teilweise überdeckt wurde, und erst im Gefolge erschien eine erhöhte Säureproduktion, die bis zum Abschluß der Myzelentwicklung andauerte. Am sechsten Tage zeigten die Trockengewichte in Zn-Kolben mit und ohne Aneurin praktisch gleiche Werte bei großer Wachstumsbeschleunigung gegenüber den Kontrollen, und die pH-Werte waren nun abgesunken auf 3,9 bis 3,5.

Auch bei der Kultivierung von *Phycomyces* (siehe unten) mißt man pH 3,5, ohne daß dadurch die Wirkung von Aneurinzusätzen annulliert würde.

Aus diesen Resultaten geht hervor, daß wir auf jeden Fall eine primäre Wirkung des Zinks auf den Pilz annehmen dürfen in der Weise, daß es ihn unempfindlich macht für eine Aneuringabe von außen. Vielleicht verstärkt die bald einsetzende Säureproduktion die Wirkung, auf keinen Fall ist sie der entscheidende Faktor.

### ff) Toxinproduktion auf Richard$_4$ + Aneurin (zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung zugegeben)

Bei diesem Versuch hatte sich gezeigt, daß eine Hemmung des Wachstums noch erreicht werden konnte, selbst wenn Aneurin erst am siebenten Tage nach der Impfung zugegeben wurde. Die Wirkung war nur noch halb so groß wie bei den Kontrollen, aber eindeutig.

Auch auf die Toxinproduktion konnte sich die verspätete Vitamingabe zu Anfang noch so stark auswirken, daß die Aktivität am zwölften Tage bei allen Aneurinkurven wesentlich geringer war als bei der Kontrolle. Anscheinend war aber die Störung am siebenten Tage besonders nachhaltig: Trotz gleichen pH-Verlaufes und auch trotz gleicher Toxizität gegen Schluß des Versuches wie in der Reihe ohne Vitamin zeigte das nicht sehr ausgeprägte Maximum am 16. Tage den tiefsten Wert der ganzen Serie.

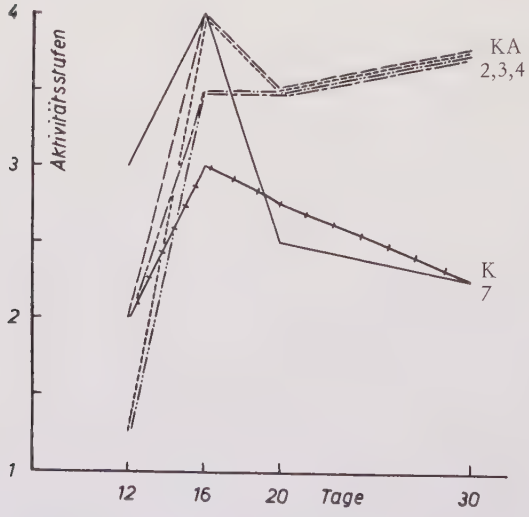



Abb. 10: Toxinproduktion von *Fusarium solani* auf Richard$_4$ bei Zugabe von 100 $\gamma$ Aneurin/l zu verschiedenen Zeiten nach der Impfung. Abszisse: Alter in Tagen. Ordinate: Aktivitätsstufen. Erklärung der Bezeichnungen siehe S. 317 Abb. 5

Aneurinzusätze am zweiten, dritten und vierten Tage wirkten sich im wesentlichen wie ein Zusatz direkt bei der Impfung aus. Die Toxinproduktion setzte entsprechend dem langsameren Wachstum etwas später ein, dauerte aber wesent-

lich länger als bei den beiden gemeinsam ausklingenden Reihen der Kontrolle und (7).

Die Toxinproduktion kann also auch durch nachträgliche Aneuringaben beeinflußt werden. Durch Zugabe am siebenten Tage wurde sie jedoch nur verzögert und verringert, nicht verlängert.

#### gg) Toxizitätssteigerung durch Aneurin, bezogen auf Myzelgewicht

Die Zahlen der folgenden Tabelle bezeichnen Einheiten pro Gramm Myzel, nicht Toxizitätsstufen. Aus den Veränderungen der Aktivitäten ist vor allem zu ersehen, daß auch in den Aneurinkolben eine Abnahme der Produktivität des Myzels mit fortschreitendem Alter eintrat. Der Rückgang war aber meist so viel schwächer als bei den Kontrollen, daß die Produktion immer noch stärker war als die Desaktivierung der Toxine im Kulturfiltrat, und so die Giftwirkung bei fortschreitendem Wachstum weiterhin leicht ansteigen konnte.

*Tabelle 5*

Toxizitätssteigerung durch Aneurin, bezogen auf 1 g Myzel
(Angabe der Einheiten)

| | Alter in Tagen | Aneurin: über 25 γ/l | Aneurin: 1 γ/l | Kontrolle | Grad der Steigerung |
|---|---|---|---|---|---|
| Abb. 7 | 6 | Spur | | Spur | |
| | 7 | 7,3 | | 4,9 | |
| | 9 | 5,7 | | 7,8 | |
| | 11 | 13,2 | | 4,3 | |
| | 14 | 35,0 | | 2,8 | **4,5-fach** |
| | 16 | 30,0 | | 3,8 | |
| | 19 | 19,2 | | 3,4 | |
| | 23 | 20,4 | | 3,4 | |
| | | a: | b: | | |
| Abb. 8 | 6 | 12,5 | 21,3 | (5,5)? | |
| | 9 | 20,0 | 15,4 | 2,7 | |
| | 13 | 20,0 | 11,0 | 1,9 | a: **12-fach** |
| | 23 | 26,0 | 31,8 | 1,9 | b: **13-fach** |
| | 33 | 46,0 | 50,0 | 2,0 | |
| | 53 | 28,4 | 30,5 | 3,8 | |
| Abb. 9 | 10 | 36,0 | | 3,3 | |
| | 18 | 26,0 | | 4,2 | **8,5-fach** |
| Abb. 10 | 12 | 17,4 | | 9,4 | |
| | 16 | 64,0 | | 15,5 | |
| | 20 | 37,7 | | 6,0 | **4-fach** |
| | 30 | 35,0 | | 6,5 | |

Der Grad der Steigerung konnte das vier- bis dreizehnfache in den vorliegenden Versuchen betragen und hing wahrscheinlich weitgehend vom Alter des Impfmaterials ab. Kulturen von älteren Konidien wurden durch Aneurin am stärksten stimuliert.

Sehr eindrucksvoll war bei der Toxinproduktion in Anwesenheit verschiedener Mengen Aneurin (Abb. 8) die Tatsache, daß die Höhe der Steigerung bei maximaler und suboptimaler Hemmung des Wachstums fast gleich war. Es ist der Beweis dafür, daß das Vitamin die Toxinproduktion bei so geringen Konzentrationen noch maximal beeinflussen kann, bei denen die Wirkung auf das Wachstum schon abgeschwächt erscheint. Die beiden Mechanismen sind also nicht direkt gekoppelt und können im physiologischen Ablauf unabhängig voneinander verschieden stark in Erscheinung treten.

Wenn wir annehmen wollen, daß die Wachstumshemmung eventuell auf der erhöhten Ausscheidung eines für den Pilz selbst schädlichen Stoffes beruht, dann läßt wahrscheinlich die Produktion dieses Stoffes schon bei geringeren Aneurinkonzentrationen nach als die Toxinproduktion. (Siehe auch Diskussion der Ergebnisse von SCHOPFER und GUILLOUD S. 333.)

Diese Zahlen zeigen uns außerdem, daß die als Bakterientoxine wirksamen Substanzen nicht für die Wachstumshemmung des Pilzes verantwortlich sein können, was an und für sich gar nicht ausgeschlossen wäre. Mit zunehmender Toxinkonzentration im Kulturfiltrat müßte dann eine entsprechend stärkere Wachstumshemmung festzustellen sein, was nicht der Fall ist.

### 4. Myzeluntersuchungen von *Fusarium solani* auf seinen Gehalt an Wachstumsfaktoren mit Hilfe einer *Phycomyces*-Art

#### a) Diskussion und Problemstellung

In der Literatur sind auch heute noch die Angaben ganz überwiegend, nach denen Aneurin einen einseitig fördernden Einfluß auf das Wachstum bestimmter Pilze ausübt. Diese Untersuchungen wurden seit der Reindarstellung des Vitamins vor allem durch SCHOPFER (20) ins Rollen gebracht und auch weiterhin von ihm und seinen Mitarbeitern fortgeführt (22).

Andere Autoren, die sich ebenfalls mit der Frage des Vitamineinflusses, besonders des Aneurins, auf die verschiedensten Mikroorganismen beschäftigten, hatten aber schon in einzelnen Fällen beobachtet, daß Aneurin unter Umständen einen wachstumshemmenden Einfluß ausüben konnte. ROBBINS und KAVANAGH (17) stellten das z. B. bei zwei Stämmen von *Rhizopus nigricans* fest, MELIN und MIDÉN (13) fanden etwas Entsprechendes bei zwei Stämmen von *Morchella conica* Pers., einem sonst aneurin-autotrophen Pilz. MELIN und NORKRANS (14) teilten in einer Arbeit über den Einfluß der Pyrimidin- und Tiazolkomponente des Aneurins auf das Wachstum von Wurzelpilzen mit, daß unter den angeführten Organismen wiederum einer gefunden wurde, *M. R. atrovirens*, der sich sonst aneurin-autotroph verhielt, bei Zusatz von Aneurin dagegen im Wachstum gehemmt wurde. Eine entsprechende Wirkung erzielten sie mit Thiazol; mit Pyrimidin allein war die Hemmung etwas schwächer.

Eine sehr ausführliche Aufzählung noch weiterer Beobachtungen in der gleichen Richtung ist dann in einer Arbeit von Schopfer und Guilloud (24, S. 271) zu finden.

Schopfer selbst hatte schon früher bei Experimenten mit *Rhizopus suinus* und anderen Arten der Gattung eine Wachstumshemmung durch Aneurin festgestellt (21). In der sehr ausführlichen Arbeit von 1945 (24) wurde dann zusammenfassend über sämtliche Ergebnisse bei allen Arbeiten mit diesem Objekt berichtet. Die Autoren beobachteten an diesem Pilz im wesentlichen die gleichen Erscheinungen, was Beeinflussung des Wachstums betrifft, wie sie hier für *Fusarium solani* beschrieben wurden.

Schopfer und Guilloud bezeichneten (S. 239) die Wirkungsweise des Aneurins im Falle von *Rhizopus suinus* als die eines auf das Wachstum „zeitweise beschleunigend wirkenden Faktors". Auf diese Phase der Beschleunigung folgte dann ebenfalls eine Hemmung.

Dammann, Rotini und Nord (7) hatten bei Untersuchungen über enzymatische Umsetzungen von *Fusarium graminearum* Schwabe *(Gibberella Saubinetii)* gefunden, daß Aneurinzusatz zur Nährlösung gleich wie zusätzliches KCN den Pilz zu gesteigerter Alkoholproduktion anregte. Schopfer und Guilloud nahmen diese Beobachtungen auf und fanden das gleiche im Fall von *Rhizopus suinus.* Durch anfängliche Alkoholzugabe zur Nährlösung wurde die Entwicklung des Pilzes in gleicher Art gestört wie in der Spätphase des Wachstums bei Anwesenheit von Aneurin.

Es muß zukünftigen Untersuchungen vorbehalten bleiben, ob die Verhältnisse bei *Fusarium solani* gleich oder ähnlich sind. Kann die Frage positiv beantwortet werden, wäre man versucht, die Behauptung aufzustellen, daß Aneurin in allen diesen Fällen einfach eine Intensivierung bestimmter Stoffwechselvorgänge verursacht. Im Grunde genommen ist also die Wirkung immer positiv. Die Hemmung des Wachstums ist sekundär und nur dann zu bemerken, wenn der Pilz auf dem entsprechenden Nährsubstrat die gesteigerte Konzentration eines Stoffwechselproduktes, z. B. von Alkohol, schlecht verträgt. Es ist dann nicht ausgeschlossen, daß bei *Rhizopus suinus* und entsprechend reagierenden Objekten durch fortwährende Unschädlichmachung des Alkohols nicht nur eine Hemmung aufgehoben werden könnte, sondern die vorerst zeitweilige Erscheinung der Wachstumsförderung dann während der ganzen Entwicklungsperiode sichtbar bliebe.

Anzeichen für eine solche Möglichkeit fanden wir bei den Untersuchungen mit *Fusarium lini, Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici, Fusarium coeruleum* und *Fusarium javanicum* (31) auf ihre Reaktion gegenüber Aneurin in Richard$_4$. Nach fünftägigem Wachstum bei 18 ° C zeigten alle vier Pilze deutliche Förderung durch das Vitamin. Nach weiteren sechs Tagen war nur *Fusarium javanicum* etwa 10 % gehemmt, *Fusarium coeruleum* schien mit und ohne Aneurin praktisch gleich stark gewachsen, *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici* und *Fusarium lini* dagegen zeigten immer noch deutliche Förderung von 30 bzw. 20 % gegenüber den Kontrollen. Vergiftet sich also ein Pilz nicht durch die eigenen Ausscheidungen, so kann er sehr wohl, auch bei annähernd ausreichender eigener Wuchsstoffproduktion, während der ganzen

Wachstumsdauer durch Aneurin zusätzlich gefördert werden. Bei solchen Objekten wäre dann die Aufteilung der Entwicklung in Früh- und Spätphase nicht möglich. In unserem Falle schien sie aber vor allem wegen der Trennbarkeit der Erscheinungen der Wachstumsförderung und Wachstumshemmung am Platze. Bei *Rhizopus suinus* gelang es SCHOPFER und GUILLOUD (24), durch Zugabe von Mesoinosit zur Nährlösung + Aneurin die Hemmungswirkung des letzteren aufzuheben. Auch hier konnte die fördernde Wirkung während der Frühphase trotzdem konstatiert werden.

Bei Kultur von *Trichoderma viride* beobachtete BLUMER (5) ebenfalls anfängliche Förderung durch Aneurin und spätere Hemmung, welche er einer möglichen Überproduktion von $NH_3$ zuschrieb.

All diese Beispiele zeigen, daß die für *Fusarium solani* näher beschriebenen Reaktionen weitere Verbreitung unter den Pilzen zu haben scheinen. Allgemeine Regeln sind nicht aufzustellen, gerade, was die Aufeinanderfolge der Symptome während Früh- und Spätphase anbetrifft. Die Verhältnisse können sich ändern von einem Objekt zum andern, aber auch bei ein und demselben Pilz, je nachdem, auf welchem Nährboden er gezüchtet wird. Die folgenden Versuche sollten nun zeigen, ob in der internen Enzymversorgung von *Fusarium solani* ein Hinweis auf seine diskontinuierliche Entwicklung zu finden war, ob also auch ohne Aneurineffekt irgendeine Unregelmäßigkeit der physiologischen Vorgänge während der beiden verschiedenen Entwicklungsstadien sichtbar wurde. Besonders interessierte die Frage, ob und auf welche Weise der Wuchsstoffgehalt in den Hyphen in Abhängigkeit ihres Alters und veränderter Nährlösung wechselte.

## b) Testmethode

### aa) Testpilz und Nährlösung

Als Testobjekt wurde der Stamm einer nicht näher bestimmten *Phycomyces*-Art benutzt, der mir freundlicherweise von Herrn Dr. BLUMER, Wädenswil, zur Verfügung gestellt wurde. Er ist aneurin-heterotroph und kann durch suboptimale Mengen des Vitamins in der Nährlösung zu verschieden starkem Wachstum angeregt werden.

Als Substrat diente die auch von SCHOPFER bei seinen Untersuchungen benutzte Nährlösung von folgender Zusammensetzung:

in destilliertem Wasser: 1,5 % Glukose puriss.
0,1 % Asparagin
0,05 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,15 % $KH_2PO_4$.

Die Temperatur betrug etwa 20 bis 22 ° C bei allen Versuchen.

### bb) Extraktion des Fusarium-Myzels

*Phycomyces*-Teste fanden schon vielerorts Anwendung und wurden nicht von allen Autoren in gleicher Weise durchgeführt. ZEHNDER (32) gibt z. B. an, daß die zu untersuchenden Materialien getrocknet und fein verrieben wurden und ein gewisses Quantum dieses Pulvers als Zusatz zur Nährlösung von *Phycomyces* diente.

Um Begleitstoffe, die auf diese Weise alle mitgetestet werden und als zusätzliche Nahrung dienen können, wenigstens teilweise auszuschalten, wurde aber bei unseren Untersuchungen mit Wasserextrakten gearbeitet. Je 1 bis 2 g Trockensubstanz (Gewicht durch Wägung von Parallelkolben festgestellt) von *Fusarium solani* wurde frisch filtriert und vier- bis fünfmal gründlich mit dest. Wasser ausgespült, um die Salze der Nährlösung zu entfernen. Mit der Hand wurde möglichst viel Feuchtigkeit ausgepreßt und das Myzel mit vorher 24 Stunden bei 150° C sterilisiertem Quarzsand im Mörser gründlich verrieben. Dann wurde das Gemisch mit einer berechneten Menge dest. Wasser versetzt, so daß immer 1 g Trockengewicht auf 50 ccm Wasser kam. In einem verschlossenen Kolben wurde das Ganze einige Tage im Kühlschrank aufbewahrt, wobei es mehrere Mal gründlich aufgeschüttelt wurde. Die nach der Filtration gewonnene Flüssigkeit war je nach Alter des Myzels verschieden klar. Besonders bis zum achten Tage waren Trübungen auch durch Porzellanfilter nicht zu vermeiden. Vom 12. bis 14. Tage an waren die Extrakte jedoch fast bis ganz klar und zeigten eine orangerote Färbung, die wahrscheinlich vor allem von javanicinähnlichen Verbindungen herrührte.

Von dem so gewonnenen, wäßrigen Myzelextrakt wurde je 1 ccm einem Kolben mit 29 ccm Nährlösung zugesetzt. Die Myzelgewichtssteigerungen von *Phycomyces* bezogen sich also in sämtlichen Kolben aller Versuche auf gleiche Mischungsverhältnisse Trockensubstanz/Wasser und gleiche Quantitäten Extrakt, so daß die Messungen direkt miteinander verglichen werden konnten, ohne zuerst umgerechnet werden zu müssen.

#### cc) Verwertung der Resultate

Die Myzelgewichte von *Phycomyces* wurden jeweils von vier bis fünf Parallelkolben bestimmt. Da es darauf ankam, die Maximalwerte zu erfassen und miteinander zu vergleichen, diese aber nicht in allen Reihen gleichzeitig auftraten, und da zudem bei suboptimalen Extraktzusätzen nach Abschluß des Wachstums bald eine starke Schrumpfung der Kulturen eintrat, mußten Zeitkurven aufgenommen werden, deren höchste Werte aus den folgenden Kurven zu ersehen sind.

Alle diese Kurven geben direkt die Myzelgewichte von *Phycomyces* wieder. Es wurde darauf verzichtet, von der Stärke des Wachstums auf eine bestimmte Menge z. B. von Aneurin zu schließen, wie dies von den meisten anderen Autoren getan wurde und wie es auf Grund der stets parallel bestimmten Kontrollkurven mit reinem Aneurin wohl möglich gewesen wäre. Die Gründe hierfür waren folgende:

Meistens zeigten die Extrakte eine beschleunigende Wirkung auf das Wachstum gegenüber reinem Aneurin. Auch war die Steigung der Kurven nicht gleich und zudem waren neben Aneurin immer noch gewisse Zellbestandteile in den Extrakten, die zusätzlich das Wachstum verstärkten. Dies zeigte sich ganz deutlich, wenn mehr als 1 ccm zugegeben wurde. 3 ccm Extrakt je 30 ccm bewirkten in den meisten Fällen bei Anwesenheit von genügend Wachstumsfaktor Myzelgewichte von 110 bis 120 mg/Kolben. Eine erhöhte Aneurindosis dagegen konnte einfach aus Mangel an Nährstoffen das Gewicht

selten über 100 mg/Kolben steigern. Die zusätzliche Erhöhung durch den Extrakt war in diesen Fällen berechenbar und betrug 10 bis 20 %. In Fällen suboptimaler Förderung dagegen konnte nicht gesagt werden, wie groß der Anteil war, der den Wachstumsfaktoren zugeschrieben werden mußte, und wie groß ein anderer, der auf Begleitstoffe anderer Art zurückzuführen war. Eine sichere Umrechnung war also nicht möglich und hätte an den für uns wichtigen Erscheinungen im wesentlichen nichts geändert. Daher wurde darauf verzichtet.

### c) Die Untersuchung von *Fusarium solani*-Myzelien auf verschiedenen Nährlösungen

#### aa) Richard$_4$

Auf Richard$_4$ wurden zwei Versuche mit verschiedenem Impfmaterial angesetzt. Es stammte beide Male von Richard$_4$-Kulturen, nur waren diese im ersten Falle (a) fünf Monate, im zweiten (b) sieben Wochen alt.

Bei der Wachstumskurve von *Fusarium solani* (Abb. 11) handelt es sich offensichtlich um einen entsprechenden Verlauf wie bei dem S. 311, Abb. 4 besprochenen, ebenfalls mit älterem Impfmaterial angesetzten Versuch, bei Abb. 12 mit ausgesprochenem Maximum und bald folgender Schrumpfung um den Typ von jüngerem Impfmaterial.

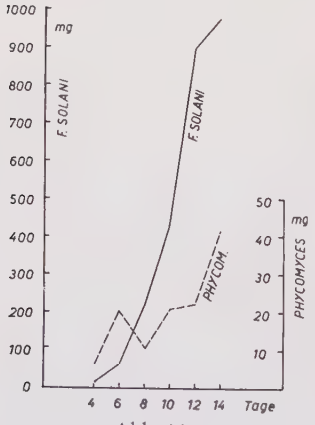



Abb. 11.

Abb. 11. Stimulation von *Phytomyces* durch Extrakte aus *Fusarium solani*-Myzel verschiedenen Alters bei Züchtung auf Richard$_4$ (a). Abszisse: Alter von *Fusarium solani* in Tagen. Ordinaten: Myzelgewichte in mg

Abb. 12. Parallelversuch (b). Legende siehe Abb. 11

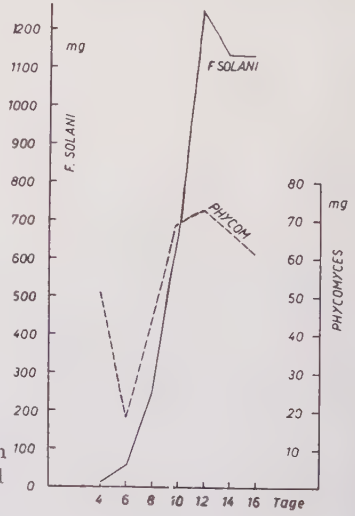



Abb. 12.

Was als erstes auffällt, ist die Tatsache, daß beide Kurven der Maximalgewichte von *Phycomyces* nicht in stetigem An- oder Abstieg verlaufen, sondern ein Minimum aufweisen: (a) am achten, (b) schon am sechsten Tage, womit wahrscheinlich auch der frühere Abschluß des Wachstums von *Fusarium* bei letzterer im Zusammenhang stand. In beiden Versuchen, mit altem wie auch mit jungem Impfmaterial, scheint also die Konzentration der Wachstumsfaktoren zuerst im wachsenden Myzel anzusteigen bis zu einem ersten Maximum, das je nach Alter der verwendeten Konidien

verschiedene Höhe aufweisen kann. Dann tritt mehr oder weniger plötzlich eine Stockung in der Produktion ein, wodurch aber keine Wachstumshemmung verursacht wird. Da sich das Myzel weiter stark vermehrt, werden die Enzyme entsprechend „verdünnt", d. h. sie entfallen auf eine relativ größere Menge Trockensubstanz. Dies ist aber nach etwa zwei Tagen wieder überwunden. Es tritt ein erneuter, etwa sechs Tage andauernder Anstieg der Wirkstoffe ein, bis dann bei einsetzender Alterung die Werte endgültig sinken.

An diesem Verlauf erscheint erstens interessant, daß sich keine direkte Beziehung zwischen An-, Ab- und Wiederanstieg der Wirkstoffkonzentrationen und, wie man erwarten würde, dem davon abhängigen Wachstumstempo zeigen läßt. Besonders eindrucksvoll ist diese Unabhängigkeit bei Versuch (b), wo wir immerhin ein Absinken der Wirkung auf *Phycomyces* um über 60 % konstatieren. Dies bewirkt ebensowenig eine Verlangsamung des Wachstums von *Fusarium solani*, wie auch das spätere Ansteigen auf das Dreifache und sogar das Fünf- bis Sechsfache keine Beschleunigung zur Folge hat. Der Pilz wächst ganz gleichmäßig mit stetig abnehmender Geschwindigkeit.

Der zweite interessante Punkt ist das zeitliche Auftreten des ersten Konzentrationsabstieges: dieser findet gerade dann statt, wenn wir auch in der Einwirkung von Aneurin in der Nährlösung einen Wendepunkt feststellen können.

Mit dem *Phycomyces*-Test haben wir zwar ein Mittel in der Hand, mit dem wir noch verschwindend kleine Mengen Wirkstoff nachweisen können und mit dessen Hilfe in gewissen Grenzen sogar relative Konzentrationsunterschiede meßbar sind. Dies ist der große Vorteil gegenüber den in diesem Fall anwendbaren, chemischen Bestimmungsmethoden.

Der Nachteil des biologischen Tests ist dagegen, daß eigentlich nicht erwiesen ist, ob wirklich nur Aneurin und seine Komponenten den begrenzenden Faktor für das Wachstum darstellen, oder ob sich ihre Wirkung nicht durch bestimmte, organische Verbindungen entscheidend steigern läßt, wenn man schon als wahrscheinlich annehmen will, daß sie durch andere Moleküle nicht total ersetzbar sind. So muß vorläufig offengelassen werden, ob die Zusammensetzung der für *Phycomyces* als Wachstumsstimulatoren in Erscheinung tretenden Stoffe vor und nach dem ersten Konzentrationsabfall praktisch gleich bleibt, d. h., daß wir nur eine zeitweilige Produktionsstockung im Myzel feststellen, nach der die Synthese der wichtigen Enzyme wieder aufgenommen wird wie vorher, oder ob nachher nicht ganz das gleiche an Wachstumsfaktoren produziert wird wie vorher, wobei trotz chemischer Veränderung gleiche Effekte bei *Phycomyces* zu beobachten wären.

#### bb) Raulin[4]

Auf diesem Nährboden wurden nur die Verhältnisse in Kulturen untersucht, die von altem Impfmaterial stammten.

Der Anfang der Kurve von *Phycomyces* verläuft hier genau entsprechend den vorher beschriebenen: Anstieg auf ein erstes Maximum, dessen absolute Höhe anscheinend (aus den zwei vorhergehenden Versuchen zu schließen) für die typische Reaktion auf Aneurin in der Frühphase nicht verantwortlich ist,

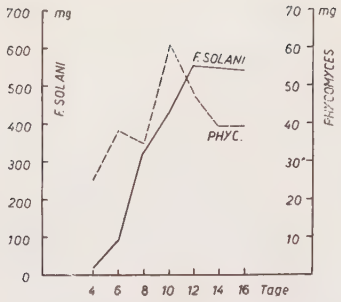



Abb. 13. Stimulation von *Phycomyces* durch Extrakte aus *Fusarium solani*-Myzel verschiedenen Alters bei Züchtung auf Raulin$_4$. Abszisse: Alter von *Fusarium solani* in Tagen. Ordinaten: Myzelgewichte in mg

d. h. der Pilz produziert schon ansehnlich, und die Konzentration an Wuchsstoffen in seinen Hyphen kann nicht direkt verantwortlich gemacht werden für seine Empfänglichkeit für Aneurin in der Nährlösung. Der folgende Anstieg der Kurve ist gering, aber vorhanden, die erste Phase läuft also zeitlich und mengenmäßig im Hinblick auf die Enzymproduktion im wesentlichen auf Raulin und Richard gleich ab. Dies steht in willkommenem Einklang mit der Tatsache, daß auch die Wachstumsförderung durch Aneurin auf Raulin und Richard gleich ist.

Der Anstieg dauert aber nur noch zwei Tage an; dann hört anscheinend die Wirkstoffproduktion auf. Der vorhandene Vorrat wird nur noch durch geringen Zuwachs „verdünnt", und die Konzentration erscheint dadurch, berechnet auf Myzelgewicht, entsprechend verringert. Mit einsetzender Schrumpfung wird weiter abgebaut, und dann bleibt die Konzentration wenigstens während einer gewissen Zeit konstant.

Auf Raulin kann sich der Pilz wahrscheinlich infolge einer Selbstvergiftung nicht voll entwickeln. Auch für die Kultivierung auf Richard$_4$ mußte in gewissem Maße eine Hemmung durch eigene Stoffwechselprodukte angenommen werden, daher die Notwendigkeit sehr reichlicher Beimpfung. Ob nun eine solche Vergiftung darin besteht, daß gewisse Ausscheidungen direkt die Enzymproduktion vorzeitig unterbinden und so ein Entwicklungsstillstand eintritt, oder ob andere lebenswichtige Funktionen in erster Linie gestört werden und erst als sekundäre Erscheinung auch die Synthese der Wirkstoffe im Gefolge der allgemeinen Schädigung leiden muß, ist aus den vorliegenden Tatsachen nicht zu ersehen.

### cc) Richard$_4$ + $ZnSO_4$

Dieser Versuch wurde wieder doppelt mit zwei verschiedenaltrigen Impfmaterialien durchgeführt: (a) altes und (b) jüngeres.

*Tabelle 6*

(Versuch [a])

Stimulation von *Phycomyces* durch Extrakte aus *Fusarium solani*-Myzel verschiedenen Alters bei Züchtung auf Richard$_4$ + $ZnSO_4$

(Myzel in mg)

| *Fusarium solani* Alter in Tagen | 3 | 5 | 7 | 9 | 12 | 14 | 17 | 20 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Fusarium solani* | 23 | 217 | 434 | 652 | 900 | 1000 | 1010 | 1000 |
| | | x 9,5 | x 2,0 | x 1,5 | x 1,4 | x 1,1 | | |
| Maximalgewicht von *Phycomyces* | 55,6 | 76,4 | 61,3 | 76,5 | 69,5 | 81,2 | 89,4 | 75,4 |

Die Wachstumskurven des *Fusarium*-Myzels zeigen wieder die charakteristischen Unterschiede. Auch das Anfangsstadium der Enzymproduktion deckt sich im Verlauf gut mit dem der Versuche auf Richard$_4$ ohne $ZnSO_4$. Dem entspricht, daß wir früher auch auf Richard$_4$ + $ZnSO_4$ während der Frühphase eine wachstumsfördernde Wirkung von Aneurin feststellten.

Der weitere Verlauf ist dagegen ganz anders als bisher beschrieben: Zwei Tage lang folgt der Anstieg nach der ersten Konzentrationsverminderung, darauf sinkt der Wirkstoffgehalt wie bei der Raulin-Kurve, in der auch $ZnSO_4$ zur Auswirkung kam, erholt sich aber nach zwei bzw. vier Tagen und steigt dann zum drittenmal an bis n a c h einsetzender Alterung der Myzeldecke.

Schon bei makroskopischer Beobachtung (siehe auch S. 315 unten) hatten wir aus der beginnenden Rotfärbung entsprechend den Raulin-Kulturen, dann aber Hinüberwechseln zu Ocker, Bildung von Luftmyzel und sehr reichlichen Sporenmengen geschlossen, daß der Anfang der Spätphase anscheinend durch Zinkeinfluß bestimmt wurde, dieser dann aber verblaßte und die günstige Zusammensetzung der Nährsalze gegen Schluß der Entwicklung zur Geltung kommen konnte.

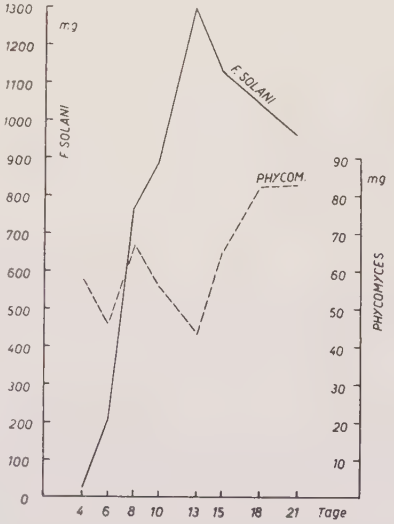



Abb. 14. (Versuch [b]) Stimulation von *Phycomyces* durch Extrakte aus *Fusarium solani* - Myzel verschiedenen Alters bei Züchtung auf Richard$_4$ + $ZnSO_4$. Abszisse: Alter von *Fusarium solani* in Tagen. Ordinaten: Myzelgewichte in mg

Aus dem Verlauf der Wirkstoffkurven ergibt sich eine Unterstützung dieser Hypothese.

Bei dem Vergleich der Wachstumskurven von *Phycomyces* und *Fusarium solani* muß aber hier nochmals betont werden, w i e w e n i g das Auf und Ab in der Wirkstoffproduktion sich in der Wachstumskurve von *Fusarium* widerspiegelt. Kaum daß wir beim jüngeren Impfmaterial zu Beginn der sehr starken Konzentrationsabnahme vom achten bis zehnten Tage eine etwas geringere Steigung der Kurve wahrnehmen. Dann hat sich der Pilz anscheinend auf die innerliche Veränderung eingestellt, wächst erneut kräftig weiter und hat am 13. Tage ein Gewicht von etwa 1300 mg/Kolben erreicht! Beim älteren Impfmaterial ist dem Myzelzuwachs nicht einmal so viel anzusehen.

### dd) Richard$_4$ + Aneurin

Entsprechend allen bisherigen Versuchen mit Aneurin war auch für diesen letzten eine konstante Temperatur von 18 ° C vorgesehen. Wegen Störungen der Kühlvorrichtung stieg sie aber leider während der Versuchsdauer dreimal über 23 °. Aus technischen Gründen kann vorläufig an eine Wiederholung

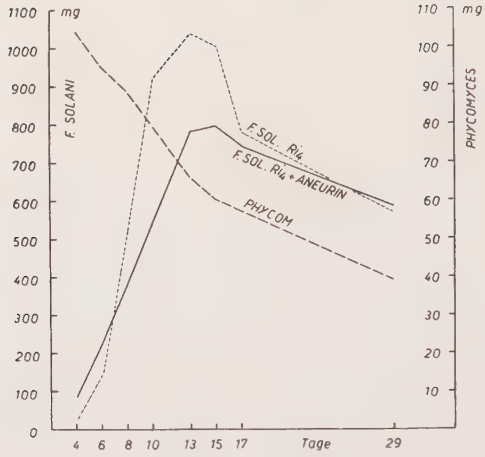



Abb. 15. Stimulation von *Phycomyces* durch Extrakte aus *Fusarium solani*-Myzel verschiedenen Alters bei Züchtung auf Richard$_4$ + Aneurin. Abszisse: Alter von *Fusarium solani* in Tagen. Ordinaten: Myzelgewichte in mg

nicht gedacht werden. So können die hier angeführten Ergebnisse nur orientierenden Charakter haben.

Es ist deutlich, daß die anfängliche Wirkstoffkonzentration im Myzel höher war als in allen vorherigen Versuchen. Das liegt wahrscheinlich daran, daß der Pilz außer des selbst produzierten Anteils auch aus der Nährlösung Aneurin in meßbarer Menge aufnahm.

Der auch normalerweise auftretende anfängliche Konzentrationsabfall wird in der Folge nicht durch einen Produktionsanstieg wieder aufgehoben, der Gehalt an Wachstumsfaktoren sinkt infolgedessen stark während der ganzen Versuchsdauer. Das Myzel wird also eventuell durch eigene Stoffwechselprodukte so stark geschädigt, daß wichtige enzymatische Vorgänge unterbunden werden.

## Zusammenfassung

1. Für das Wachstum von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. lag das Temperaturoptimum bei Kultur auf Malzagarplatten bei 27 ° C. Die maximale, gerade noch erträgliche Temperatur betrug 34 °.
2. Die Toxinbildung des Pilzes wurde mit Hilfe von *Bacterium mycoides* im Bouillon-Verdünnungstest gemessen.
3. Auf Richard- wie auf Raulin-Lösung wurde das Toxizitätsmaximum bei höheren Temperaturen (über 21 °) früher erreicht als bei tieferen (unter 18 °). Dagegen war die Stärke der Giftwirkung wesentlich höher, wenn man dem Pilz bei tieferer Temperatur längere Zeit zur Entwicklung ließ.
4. Aneurinzusatz zur Richard-Lösung (über 10 $\gamma$/l) bedingte während der ersten sechs bis sieben Tage (Frühphase) bei 18 ° eine Wachstumsförderung, später (Spätphase) eine Wachstumshemmung.

   Die erst während der Spätphase in meßbarer Stärke auftretende Toxinproduktion/g Myzel wurde durch Aneurin um das vier- bis dreizehnfache gesteigert.
5. Bei etwa 1 $\gamma$ Aneurin/l Richard zeigte sich verminderte Beeinflussung des Wachstums, dagegen noch maximale Förderung der Toxinproduktion. Bei 0,1 $\gamma$/l bestand keine Wirkung des Vitamins mehr.
6. Auf Raulin-Lösung und Richard + $ZnSO_4$ bewirkte Aneurin nur eine Wachstumsförderung während der Frühphase, später dagegen keine Hemmung und auch keine Förderung der Toxinproduktion.

7. Wurde zu einer Richard-Kultur erst am dritten bis siebenten Tage nach erfolgter Impfung Aneurin in wirksamen Mengen zugesetzt, so trat nur die wachstums h e m m e n d e Wirkung und eine Beeinflussung der Toxinproduktion in Erscheinung.
8. Veränderung des Wachstums und der Toxinproduktion durch Aneurin konnten unabhängig voneinander verschieden stark in Erscheinung treten. Daher kommt eine Vergiftung von *Fusarium solani* durch die im Bakterientest gemessenen Toxine nicht in Frage.
9. Mit Hilfe einer nicht näher bestimmten *Phycomyces*-Art wurde der Gehalt an Wachstumsfaktoren (besonders Aneurin) in wäßrigem Myzelextrakt von *Fusarium solani* bei verschiedenem Alter des Pilzes auf Richard-, Raulin- und Richard + $ZnSO_4$-Lösung gemessen.
10. Während der Frühphase zeigte das *Fusarium* auf allen drei Nährlösungen ähnliche Schwankungen der Wuchsstoffkonzentration. Später traten dagegen charakteristische Unterschiede auf. Dies entspricht dem gleichartigen Verhalten auf den verschiedenen Nährböden gegenüber Aneurin während der Frühphase und unterschiedlichen Reaktionen auf das Vitamin während der Spätphase.

## Literaturverzeichnis


1. Arnstein, H. R. V. und Cook, A. H., 1947. Production of antibiotics by fungi. Part III. Javanicin, an antibacterial pigment from *Fusarium javanicum*. J. Chem. Soc. **189**, 1021.
2. — —, — — und Lacey, M. S., 1946. An antibacterial pigment from *Fus. javanicum*. Nature **157**, 333.
3. — —, 1946. Production of antibiotics by fungi. Part II. Production by *Fus. javanicum* and other *Fusaria*. Brit. J. Exptl. Path. **27**, 349.
4. Baron, A. L., 1950. Handbook of antibiotics.
5. Blumer, S., 1944. Beiträge zur Physiologie von *Trichoderma viride* Pers. et Fries. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **54**, 605—624.
6. Carr, Lloyd, G., 1946. Action of supernatants from combined growth of *Fus. solani* and *Pseudomonas aeruginosa* against the tubercle bacillus. U.S. Naval. Med. Bull. **46**, (2) 237—238. Zit. nach Biol. Abstr. **20**, (1946), 10563.
7. Dammann, E., Rotini, O. T. und Nord, F. F., 1938. Enzymatische Umsetzungen durch *Fus. graminearum* Schwabe *(Gibberella Saubinetii)*, zugleich Beitrag zur Wirkungsweise der Blausäure und des Vit. $B_1$. Biochem. Ztschr. **297**, 184.
8. Ettlinger, L., 1946. Zur kulturellen Entwicklung von Penicillin. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **56**, 681.
9. Gäumann, E., 1951. Pflanzliche Infektionslehre, 2. erweiterte Auflage, Birkhäuser Basel.
10. — —, Roth, Stephi, Ettlinger, L., Plattner, Pl. und Nager, U., 1947. Enniatin, ein neues, gegen Mycobakterien wirksames Antibiotikum. Experienta Vol. III/5, 202.
11. Goss, R. W., 1940. Eine Trockenfäule an Kartoffelstauden, verursacht durch *Fus. solani* (Mart.) App. et Wr. Phytopath. **30**, 160.
12. Lansade, M., 1949. Untersuchungen über die Fusariose oder Trockenfäule bei Kartoffeln, verursacht durch *Fus. caeruleum* (Lib.) Sacc. B. T. I. **41**, 1949.
13. Melin, E. und Midén, G., 1941. *Morchella conica* Pers., ein aneurin-autotropher Pilz. Svensk. Bot. Tidskrift **35**, 333.
14. — — und Norkrans, B., 1942. Über den Einfluß der Pyrimidin- und der Thiazolkomponente des Aneurins auf das Wachstum von Wurzelpilzen. Svensk. Bot. Tidskrift, **36**, 271—286.
15. Nager, U., 1948. Dissertation. Zürich, E. T. H.

16. Ocfemia, G. O., Manzo, I. C. und Celino, M. S., 1936. Vorkommen der Gummikrankheit an Citrus auf den Philippinen. Zit. nach Biol. Abstr. **10**, (1936) Nr. 17917.
17. Robbins, W. J. und Kavanagh, F., 1938. Vitamin $B_1$ or its intermediates and growth of certain fungi. Amer. J. Bot. **25**, 229.
18. Ruelius, H. W. und Gauhe, Adeline, 1950. Über Fusarubin, einen Naphtochinonfarbstoff aus *Fusarien*. Ann. Chem. **569**, 38—59.
19. — —, — —, 1950. Über einen Oxynaphtochinonschwefelsäure-Ester aus *Fusarien*. Ann. Chem. **570**, 121—126.
20. Schopfer, W. H., 1934. Versuche über die Wirkung von reinem kristallisierten Vitamin B auf *Phycomyces*. Ber. Dtsch. Bot. Ges. **52**, 560.
21. — —, 1935. Etude sur les facteurs de croissance. Action de la vitamine cristallisée $B_1$ et de l'extrait de germe de blé sur *Rhizopus* et d'autres *Mucorinées*. Zeitschr. f. Vitaminforsch. **4**, 187.
22. — —, 1939. Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Mikroorganismen mit besonderer Berücksichtigung des Vit. $B_1$. Erg. d. Biologie **16**, 1—172.
23. — —, 1942. Les facteurs de croissance pour *Rhizopus suinus*. Déterminisme et relativité des pouvoirs de synthèse. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. Sitten (1942), S. 122—123.
24. — — und Guilloud, M., 1945. Recherches expérimentales sur les facteurs de croissance et le pouvoir de synthèse de *Rhizopus Cohnii* Berl. et de Toni *(Rhiz. suinus* Nielsen). Ztschr. f. Vitforsch. **16**, 181—296.
25. Sirag-el-Din, Ahmed, 1934. Citrus gummosis in Egypt. Zit. nach Biol. Abstr. **9**, (1935), Nr. 10960.
26. — —, 1931. The citrus twig gum disease in Egypt. Zit. nach Biol. Abstr. **7**, (1933), Nr. 497.
27. Taubenhaus, J. J., 1926. Studies of a new *Fusarium* wilt of spinach in Texas. Zit. nach Biol. Abstr. **1**, (1927), Nr. 8753.
28. — —, 1935. *Fusarium* crown and root rot, and *Sclerophoma* stem blight of the Texas bluebell. Zit. nach Biol. Abstr. **10**, (1936), Nr. 17924.
29. White, H. L., 1937. Diseases of beans in glasshouses. Zit. nach Biol. Abstr. **21**, (1947), Nr. 15753.
30. Wilkins, W. H. und Harris, G. C. M., 1942. Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of 100 fungal species. Brit. J. Exptl. Path. **24**, 141.
31. Wollenweber, H. W. und Reinking, O. A., 1935. Die *Fusarien*, ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung. Paul Parey, Berlin.
32. Zehnder, A., 1949. Über den Einfluß von Wuchsstoffen auf Flechtenbildner. Ber. Schweiz. Bot. Ges. **59**, 201—267.

Meinem Lehrer, Herrn Prof. Dr. E. Gäumann, bin ich zu großem Dank verpflichtet für die Großzügigkeit, mit der er die Durchführung der vorliegenden Arbeit stets unterstützte. Auch Herrn Prof. Dr. F. Kobel und Herrn Dr. R. Fritzsche, Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil, sage ich meinen besten Dank, daß sie mir die Beendigung meiner Arbeiten erleichterten.

Ganz besonders möchte ich aber an dieser Stelle Herrn Dr. S. Blumer, Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil, danken, der mir in freundlichster Weise seine eigene Erfahrung zur Verfügung stellte und mir besonders zum Schluß nützliche Ratschläge und wertvolle Anregungen zuteil werden ließ.

*Aus der Eidg. Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon und aus der Eidg. Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil*

# Der Einfluß von $Cu^{+2}$-Ionen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis*

Von

E. Müller und W. Biedermann

*Mit 3 Abbildungen*

Über das Wesen der Kupfervergiftung von Pilzsporen weiß man heute noch wenig, obwohl darüber schon zahlreiche Arbeiten erschienen sind. In einer früheren Publikation (Biedermann und Müller, 1951) berichteten wir über Vorgänge, welche sich an der Sporenoberfläche abspielen. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich hingegen in erster Linie mit den Verhältnissen im Innern der Sporen, wobei als Untersuchungsmethode wiederum der Sporenkeimtest benützt wurde.

Zwei Fragen standen dabei im Mittelpunkt. Erstens interessierten wir uns für eine zeitliche Analyse der Keimung unter Kupfereinfluß. Beim Sporenkeimtest wird ja normalerweise die Ermittlung der Ergebnisse erst in einem Zeitpunkt vorgenommen, da keine weitere Keimung mehr zu erwarten ist. Demgegenüber wollten wir erfahren, innerhalb welcher Zeit und auf welche Weise dieser Endzustand erreicht wird. Zweitens wollten wir den Einfluß von zeitlich beschränkten Giftwirkungen kennen lernen. Hierfür stand uns in dem intensiv wirkenden Komplexbildner Komplexon III ein geeignetes Hilfsmittel zur Verfügung (Biedermann und Müller, 1951).

Methodisch gingen wir gleich vor wie bei den früher beschriebenen Versuchen. Als Testpilz verwendeten wir wiederum *Alternaria tenuis.* Wir brachten auf gut gereinigte und entfettete Objektträger je zwei einzelne Tropfen einer Sporensuspension von definierter Sporendichte. Dann fügten wir jedem dieser Tropfen einen gleich großen Tropfen $CuCl_2$-Lösung zu. (Wegen der dabei stattfindenden Verdünnung wurden die Lösungen in doppelter Konzentration angewendet.) Die Objektträger legten wir zur Sporenkeimung in feuchte Schalen. Zu jedem Versuch haben wir selbstverständlich eine Kontrolle mit destilliertem Wasser angesetzt. — Zur Auswertung wurden pro Verfahren 200 Sporen ausgezählt und die Prozente gekeimter Sporen berechnet *(Keimungsziffer).* Nur bei den Versuchen, in denen wir die Keimungsziffer stündlich ermittelten, zählten wir aus zeitlichen Gründen pro Verfahren bloß 100 Sporen aus. — Alle Ergebnisse sind auf ihre Reproduzierbarkeit geprüft.

### 1. Der zeitliche Ablauf der Sporenkeimung bei Zugabe von subletalen Cu-Mengen

Nach unseren Beobachtungen beginnt die Keimung der Sporen mit einer schwachen Quellung. Später erscheinen eine oder mehrere Ausstülpungen, die im Gegensatz zur braungefärbten Spore farblos sind und sich rasch verlängern, falls sie nicht gehemmt werden. Zur Ermittlung des Keimungsablaufes unter Kupfereinfluß haben wir stündlich die Keimungsziffer bestimmt. Auf die Differenzen in der Länge der ausgebildeten Keimschläuche konnten wir dagegen nicht eingehen, da *Alternaria tenuis* hierfür kein geeignetes Objekt ist (häufig Bildung mehrerer Keimschläuche, rasches Wachstum, häufig krumme, gewundene Form).

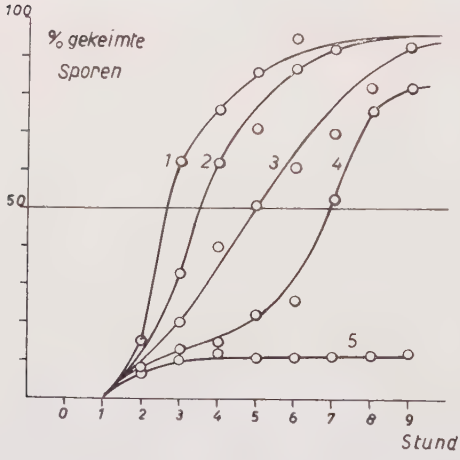



Abb. 1. Der Einfluß von subletalen Kupferdosen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis*. Abszisse: Keimzeit. Ordinate: % gekeimte Sporen.
Kurve 1: ohne Kupfer.
Kurve 2: mit $2{,}5 \cdot 10^{-6}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5,6
Kurve 3: mit $4{,}0 \cdot 10^{-6}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5,4
Kurve 4: mit $6{,}3 \cdot 10^{-6}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5,2
Kurve 5: mit $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5,0

Läßt man die Sporen von *Alternaria tenuis* in destilliertem Wasser keimen (wir verwendeten wiederum doppelt destilliertes Wasser), so ergibt sich ein Keimungsablauf, wie er in Kurve 1 der Abb. 1 dargestellt ist. Schon nach Ablauf von zwei Stunden weisen die rasch keimenden Sporen einen Keimschlauch auf, nach vier Stunden haben bereits 75 % der Sporen gekeimt, und nach sechs Stunden sind auch die letzten Nachzügler gefolgt. Entsprechend dieser raschen Keimung ist die resultierende Kurve steil. Führt man hingegen den Versuch in Gegenwart von $2.5 \cdot 10^{-6}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ (pCu 5.6) aus, so tritt eine leichte Verzögerung der Sporenkeimung ein (Kurve 2, Abb. 1). Die endgültige Keimungsziffer wird aber nicht herabgesetzt.

Besonders schön tritt die Kupferwirkung bei Kurve 4 (mit $6.3 \cdot 10^{-6}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5.2) zutage. Hier lassen sich deutlich drei Phasen unterscheiden. Während der ersten zwei Stunden verläuft die Keimung — soweit sie durch diesen Test erfaßbar ist — gleich wie im Cu-freien Versuch, der durch die Kurve 1 dargestellt wird. Dann aber schließt eine Phase an, während der die weitere Keimung praktisch vollständig unterbunden ist; die Kurve verläuft hier flach. Nach einer bestimmten Zeit — in diesem Fall

nach fünf Stunden — setzt die Keimung erneut ein, und die Kurve verläuft wieder steiler. Diese drei Phasen zeigen sich ebenfalls, wenn auch weniger deutlich, in den Kurven 2 und 3.

Der $LD_{50}$-Wert der Sporen (Kupferkonzentration, bei der 50 % der Sporen am Keimen verhindert werden) lag in diesem Fall im Gebiet von pCu 5.1. Wendet man höhere Konzentrationen an ($1.0 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt $Cu^{+2}$ = pCu 5.0), so wird die dritte Phase unterdrückt (Kurve 5, Abb. 1). Wohl gelingt es in diesem Fall einigen rasch keimenden Sporen, einen Keimschlauch zu treiben. Indessen vermögen sich die einmal geschädigten Sporen nicht mehr zu erholen.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß das Kupfer nicht momentan, sondern erst nach einer gewissen Zeit zur vollen Wirkung gelangt. Der Anfang der Kurve verläuft nämlich in jedem Fall sehr ähnlich. Wir stellen uns deshalb vor, das Kupferion könne seine Wirkung erst entfalten, wenn es in die Spore eingedrungen ist. Während der Anlaufphase würde demnach die Kupferkonzentration im Sporeninnern ständig ansteigen, bis sie den toxischen Wert erreicht hat. — Für die nachträgliche Erholung fehlt vorläufig jede gesicherte Erklärung.

## 2. Anwendung subletaler Cu-Dosen nach einer Vorkeimung in Wasser ohne Kupfer

Man wird sich auch fragen, wieweit sich die Cu-Empfindlichkeit einer einzelnen Spore während des Keimungsvorganges verändert, ob also die Giftigkeit des Kupfers vom Zeitpunkt abhängt, in welchem es die Spore erreicht.

*Tabelle 1*

Keimung in Gegenwart von $1,0 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt Cu, zugegeben nach verschiedenen Vorkeimzeiten

| Auszählung nach Stunden | Kupferzusatz nach einer Vorkeimzeit von | | | | | | | | | Wasser ohne Cu-Zusatz |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0 St. % gek. | 1/2 St. % gek. | 1 St. % gek. | 1 1/2 St. % gek. | 2 St. % gek. | 2 1/2 St. % gek. | 3 St. % gek. | 3 1/2 St. % gek. | 4 St. % gek. | |
| 2 | * 4 | * 4 | * 5 | * 11 | 10 | 10 | | | | 10 |
| 3 | 8 | 7 | 9 | 13 | * 16 | * 26 | 27 | 25 | | 27 |
| 4 | 8 | 8 | 9 | 13 | 26 | 35 | * 36 | * 36 | 39 | 39 |
| 5 | 9 | 9 | 17 | 18 | 36 | 43 | 48 | 53 | * 53 | 81 |
| 6 | 9 | 9 | 17 | 27 | 36 | 50 | 52 | 57 | 63 | 88 |
| 7 | 9 | 9 | 17 | 31 | 38 | 51 | 53 | 59 | 67 | 92 |
| 8 | 9 | 9 | 17 | 31 | 38 | 51 | 53 | 59 | 71 | 95 |
| 9 | 12 | 15 | 25 | 33 | 43 | 54 | 70 | 73 | 76 | 96 |
| 24 | 62 | 75 | 84 | 88 | 95 | 94 | 96 | 96 | 95 | 97 |

* Kupferzugabe

Um diese Frage abzuklären, ließen wir die Sporen in kupferfreiem, nämlich doppelt destilliertem Wasser v o r k e i m e n. Nach abgestuften Vorkeimzeiten wurde zu diesen Sporensuspensionen ein Tropfen Kupferlösung gegeben und die Keimungsziffer von Stunde zu Stunde ermittelt. Als Kupferkonzentration wählten wir $1.0 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt Cu (pCu 5.0). Es sei darauf hingewiesen, daß im angeführten Beispiel die Sporen weniger kupferempfindlich waren als im vorhin besprochenen, weshalb die Zahlen nicht ohne weiteres mit jenen verglichen werden können.

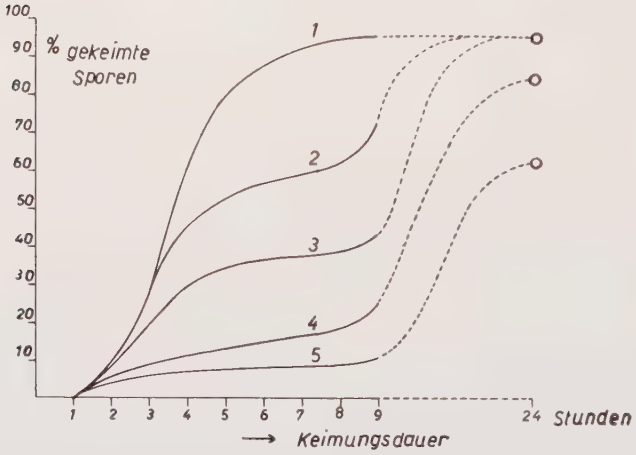



Abb. 2. Der zeitliche Verlauf der Sporenkeimung bei *Alternaria tenuis*, Kupferzusatz nach verschiedenen Vorkeimzeiten. Abszisse: Keimzeit. Ordinate: % gekeimte Sporen. Kurve 1: Kontrolle ohne Kupferzusatz. Kurven 2—5: mit einem Kupferzusatz von $1{,}0 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt, und zwar Kurve 2 nach einer Vorkeimung von 3½ Stunden, Kurve 3 nach 2 Stunden, Kurve 4 nach 1 Stunde und Kurve 5 ohne Vorkeimung

Kurve 5 in Abb. 2 zeigt den Keimungsablauf bei Zusatz der Kupferlösung zur Zeit 0; die Kurven 4, 3, 2 beziehen sich auf die Verfahren, bei denen wir die Sporen vor der Kupferzugabe in Wasser vorkeimen ließen, und die Kurve 1 zeigt die Sporenkeimung ohne Kupferzusatz. Wenn auch die endgültigen Keimungsziffern nicht sehr große Unterschiede erkennen lassen, so zeigt sich doch, daß mit der Kupferzugabe eine Hemmphase einsetzt, an welche sich eine Erholungsphase anschließt. Aus der Tabelle 1 geht zudem hervor, daß sich die Hemmphase erst nach ein bis eineinhalb Stunden voll, nämlich in einem flachen Kurvenverlauf äußert.

Je später die Zugabe des Kupfers erfolgt, desto weniger deutlich tritt die Giftwirkung zutage. Man muß dies wohl so verstehen, daß die Keimung vor der Vergiftung einen Vorsprung gewinnt. Möglicherweise hat die schützende Wirkung der Vorkeimung noch eine andere Ursache: Wie in einem andern Zusammenhang gefunden wurde, vermögen Ausscheidungsstoffe der Sporen Kupfer zu inaktivieren. Je länger also die Vorkeimzeit dauert, desto mehr von diesen Ausscheidungsstoffen werden produziert, und um so mehr Kupfer kann demnach inaktiviert werden.

Im übrigen geht auch aus diesem Beispiel hervor, daß das Kupfer eine gewisse Zeit benötigt, um zur Wirkung zu gelangen.

### 3. Anwendung letaler Dosen mit zeitlich beschränkter Wirkung

Beim Sporenkeimtest, wie er z. B. zur Prüfung von Kupferfungiziden angewendet wird, nimmt man sogenannte *dosis-response*-Kurven auf. Als

Ordinate wird dabei die Keimungsziffer, als Abszisse die Konzentration des verwendeten Giftes aufgetragen. Die Vergiftungsdauer ist konstant und wird meistens zu 24 Stunden gewählt.

Im Unterschied dazu haben wir diesmal nicht die Giftkonzentration, sondern die Vergiftungsdauer variiert. Um die Giftwirkung des Kupfers zu unterbrechen, setzt man im gewünschten Zeitpunkt einen starken Komplexbildner zu. Das in der Lösung befindliche Kupfer wird hierdurch gebunden und biologisch inaktiv (Biedermann und Müller, 1951). Wir verfügen somit über eine Möglichkeit, die Einwirkungszeit des Kupfers beliebig zu dosieren.

Als Komplexbildner wählten wir Komplexon III (in Form des Trinatriumäthylendiamin-tetraacetats), welches nach logarithmisch abgestuften Zeiten zur Mischung von Sporensuspension mit Cu-Lösung gegeben wurde. (Ob das Komplexon in die Sporen einzudringen vermag und das Kupfer auch im Innern der Sporenzellen inaktiviert, entzieht sich unserer Kenntnis). — Die Auszählung erfolgte in den meisten Fällen nach 24 Stunden. In einem Fall haben wir auch die zeitliche Entwicklung durch stündliches Auszählen verfolgt, wobei eine Hemmphase mit nachträglicher Erholung auftrat, wie dies in den Abschnitten 1 und 2 beschrieben ist.

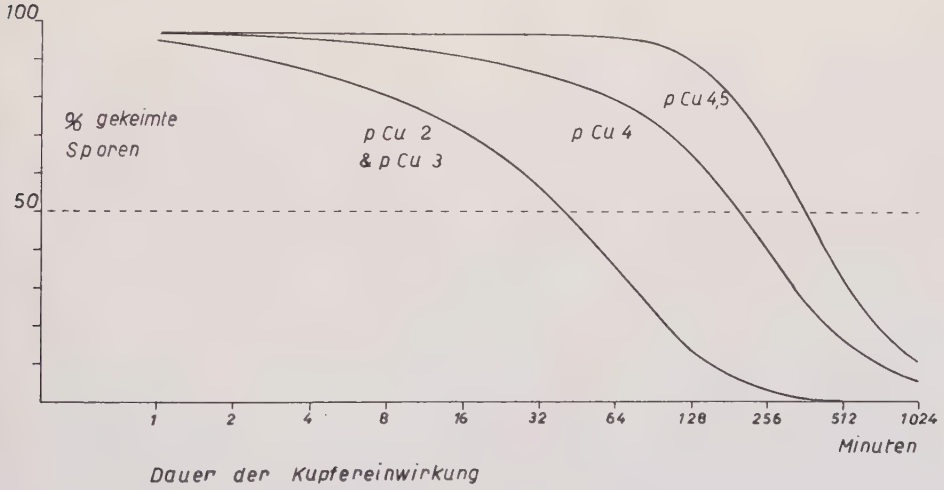



Abb. 3. Die Keimung als Funktion der Kupfereinwirkungszeit, Auszählung nach 24 Stunden. Abszisse: Dauer der Kupfereinwirkung in Minuten (logarithmischer Maßstab). Ordinate: Keimungsziffer. Kurve 1 mit pCu 4,5 = $3{,}2 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt, Kurve 2 mit pCu 4,0 = $1{,}0 \cdot 10^{-4}$ Mol/lt $Cu^{+2}$, Kurve 3 mit pCu 3,0 = $1{,}0 \cdot 10^{-3}$ Mol/lt, Kurve 4 mit pCu 2,0 = $1{,}0 \cdot 10^{-2}$ Mol/lt Cu.

Wir führten die Versuche mit folgenden Kupferkonzentrationen durch: $3.2 \cdot 10^{-5}$ Mol/lt Cu (pCu 4.5), $1.0 \cdot 10^{-4}$ Mol/lt (pCu 4.0), $1.0 \cdot 10^{-3}$ Mol/lt (pCu 3,0) und $1.0 \cdot 10^{-2}$ Mol/lt (pCu 2,0).

Die Ergebnisse eines Versuchsbeispieles sind in Tab. 2 und in Abb. 3 zusammengestellt. Wie erwartet, wirkt sich eine kurzfristige Vergiftung nicht auf das Resultat aus. Mit der relativ schwachen Konzentration von $3.2 \cdot 10^{-5}$

Mol/lt $Cu^{+2}$ erhält man sogar noch bei einstündiger Vergiftung volle Keimung, und erst mehrstündige Kupfereinwirkung vermag die Keimungsziffer deutlich zu senken. — Höhere Cu-Konzentrationen wirken in kürzerer Zeit, so daß sich die Kurven mit zunehmender Cu-Konzentration nach links verschieben (Kurven 2 und 3, Abb. 3).

*Tabelle 2*

Der Einfluß von letalen Kupferdosen auf die Sporenkeimung von *Alternaria tenuis* bei verschiedenen Einwirkungszeiten. Auszählung nach 24 Stunden

| Einwirkungszeit des Kupfers auf die Sporen. Minuten | p Cu 2 gekeimte Sporen % | p Cu 3 gekeimte Sporen % | p Cu 4 gekeimte Sporen % | p Cu 4,5 gekeimte Sporen % |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 95 | 97 | 96 | 96 |
| 1 | 95 | 95 | 97 | 97 |
| 2 | 93 | 92 | 93 | 95 |
| 4 | 86 | 84 | 92 | 97 |
| 8 | 81 | 81 | 92 | 96 |
| 16 | 64 | 64 | 88 | 94 |
| 32 | 57 | 54 | 86 | 95 |
| 64 | 39 | 36 | 80 | 95 |
| 128 | 13 | 26 | 65 | 90 |
| 256 | 7 | 14 | 41 | 68 |
| 512 | 0 | 6 | 13 | 32 |

Sofern die Unterschiede in der Kupferwirkung lediglich auf Diffusionsunterschieden gegen das Sporeninnere beruhen würden, könnte man eine einfache Beziehung zwischen Kupferkonzentration und Einwirkungszeit erwarten (z. B. Anwendung des FICKschen Diffusionsgesetzes). Wir konnten jedoch aus den vorliegenden Zahlen keine derartige Gesetzmäßigkeit erkennen.

Unter Berücksichtigung der natürlichen Streuung und unvermeidlicher Versuchsfehler stimmen die Ergebnisse der Konzentrationen pCu 3 und pCu 2 so gut überein, daß die entsprechenden Kurven aufeinanderfallen. Dies läßt auf eine Sättigung der Sporenoberfläche mit Kupferionen schließen, die bei etwa pCu 3 erreicht wird. Dieses Verhalten bestätigt unsere frühere Ansicht, wonach der Sporenoberfläche die Eigenschaft eines Ionenaustauschers zukommt (BIEDERMANN und MÜLLER 1951). Leider war es nicht möglich, die Sättigungserscheinung bei noch höheren Kupferkonzentrationen zu überprüfen; Mischungen von $Cu^{+2}$ und Komplexon III besitzen nämlich in noch größerer Konzentration selbst Hemmwirkungen, eine Erscheinung, die wie Tastversuche ergaben, noch für manche andere konzentrierte Salzlösung gilt.

## Diskussion

Aus den vorliegenden Versuchen lesen wir als wesentliches Ergebnis die Erscheinung der Restitution heraus: Die durch Kupfer vergifteten Sporen besitzen die Fähigkei , sich zu erholen (vgl. Abb. 1 und 2), was von Bedeutung ist für das Verständnis des Sporenkeimtestes. Die Kupferwirkung läßt sich nicht auf eine einfache chemische Reaktion im Innern der Sporenzellen zurückführen; der Kupfereffekt kommt vielmehr als eine Folge verschiedener Vorgänge zustande: 1. Anlagerung der Cu-Ionen an die Sporenoberfläche, 2. Diffusion des Kupfers ins Sporeninnere, 3. Eingriff in die Lebensvorgänge im Innern der Spore, wodurch die weitere Keimung verhindert oder 4. nur vorübergehend gehemmt wird. Dabei wäre es überdies möglich, daß das Kupfer nicht bloß an einer, sondern an mehreren Stellen ins biologische Geschehen der Zelle eingreift. Um so überraschender ist die ausgezeichnete Reproduzierbarkeit von Sporenkeimtesten (Biedermann und Müller, 1951).

Für die Entfaltung der Giftwirkung ist eine toxische Konzentration im Innern der Spore erforderlich. Um diese zu erreichen, sind bei der Anwendung geringer Cu-Konzentrationen lange Gifteinwirkungszeiten erforderlich, wogegen bei hohen Cu-Konzentrationen sehr kurze Vergiftungszeiten ausreichen. Allerdings werden diese mit steigender Cu-Konzentration nicht beliebig klein: Bei pCu 3 ist die Sporenoberfläche mit Cu-Ionen besetzt, so daß bei einer weiteren Erhöhung der Cu-Konzentration die Giftwirkung nicht mehr zunimmt.

## Zusammenfassung

An *Alternaria tenuis* wurde der zeitliche Ablauf der Sporenkeimung untersucht:

1. Durch die Gegenwart von subletalen Cu-Dosen wird der Keimungsvorgang verzögert. Die Sporen werden zunächst vergiftet, vermögen sich jedoch zu erholen und keimen mit einer Verspätung, welche von der Kupferkonzentration abhängig ist.
2. Vorkeimen in Wasser schwächt die Wirkung des Cu-Ions ab.
3. Durch die Zugabe von Komplexon III können Letaldosen an $Cu^{+2}$ zu beliebiger Zeit unwirksam gemacht werden. Mit zunehmender Vergiftungsdauer ergab sich dabei eine Verstärkung der keimungshemmenden Wirkung.
4. Mit steigender Cu-Konzentration tritt eine Sättigung der Sporenoberfläche durch $Cu^{+2}$-Ionen ein.

## Summary

The hourly development of the spore germination of *Alternaria tenuis* has been investigated:

1. The germination can be retarded by sublethal doses of copper. At first the spores are poisoned, but later they recover. The retardation of their germination is a function of the copper-concentration used.

2. Soaking the spores in water before treatment weakens the copper effect.
3. Lethal doses of copper can be inactivated at any time during spore treatment by the addition of Komplexon III. The poisoning effect is the more violent the longer the copper has been acting on the spores.
4. The effect of the copper does not increase in violence above a concentration of pCu 3.0. It is deduced that at this level copper concentration the surfaces of the spores are saturated with copper ions.

## Literaturverzeichnis

Biedermann, W. und Müller, E., 1951, Die Inaktivierung des gelösten Kupfers (II) in Fungiciden. Phytopath. Ztschr. **18**, p. 307 ff.

*Aus dem Institut für spezielle Botanik*
*der Eidgenössischen Technischen Hochschule in Zürich*
*Direktor: Prof. Dr. E. Gäumann*

# Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*

Von
H. Kern

*Mit 5 Abbildungen*

Inhalt: Einleitung. — 1. Kap. Der Krankheitsverlauf der *Fusarium*-Welke bei verschiedenen Tomatensorten. — 2. Kap. Wirkungen des Tomatins auf *Fusarium lycopersici* und andere Pilze. A. Wirkungen auf die Sporenkeimung. B. Wirkungen auf das Myzelwachstum. — 3. Kap. Der Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten. A. Allgemeines. B. Bestimmungsmethoden. C. Ergebnisse. — 4. Kap. Die Toxinbildung durch *Fusarium lycopersici* in vitro. A. Die Toxigenität verschieden pathogener Stämme. B. Der Einfluß von Tomatin auf die Toxinbildung. C. Die Wirkung von Preßsäften aus Tomatenpflanzen auf die Toxinbildung. — 5. Kap. Toxinresistenz. — 6. Kap. Diskussion. — Zusammenfassung. — Literaturverzeichnis.

## Einleitung

Eine Pflanze vermag sich ihrer Parasiten auf zwei Arten zu erwehren: durch die strukturellen Hindernisse, die sie ihnen entgegenstellen kann, und durch ihre Fähigkeit zu Abwehrreaktionen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich nur mit der ersten Möglichkeit (Axenie, passive Resistenz; Gäumann, 1951 a, Seite 337—375). Die hier in Frage kommenden, Infektion oder Ausbreitung eines Krankheitserregers hemmenden Faktoren bestehen also bereits vor einer Auseinandersetzung zwischen Wirt und Parasit; sie sind der Ausdruck der auf seiten des Wirtes vorhandenen Voraussetzungen, nicht aber seiner aktiven Abwehr.

Als Resistenzfaktoren sind in verschiedenen Fällen die Alkaloide der Wirtspflanze angesprochen worden, so z. B. von Greathouse (1938) zur Erklärung der unterschiedlichen Widerstandsfähigkeit von über 2000 Pflanzenarten gegen *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar, den Erreger der nordamerikanischen Texas-Wurzelfäule (vgl. Gäumann, 1951 a, Seite 369). In ähnlicher Weise wurde versucht, die Unterschiede in der Resistenz verschiedener Tomatensorten gegen *Cladosporium fulvum* Cooke, den Erreger der Braunfleckenkrankheit, und gegen *Fusarium lycopersici* Sacc., den Erreger einer Welkekrankheit, auf ihren unterschiedlichen Alkaloidgehalt zu-

rückzuführen; doch ist der Nachweis für die Richtigkeit dieser Annahme noch nicht erbracht worden.

Im folgenden soll die Frage geprüft werden, ob das Tomatin, ein aus verschiedenen Tomatensorten isoliertes Alkaloid-Glykosid, einen Resistenzfaktor gegen das *Fusarium lycopersici* darstellt (IRVING, FONTAINE und DOOLITTLE, 1945; IRVING, 1947; GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER, 1950).

## 1. Kapitel

## Der Krankheitsverlauf der *Fusarium*-Welke bei verschiedenen Tomatensorten

Es gibt zahlreiche Pflanzenparasiten (vor allem Pilze), die an ihren Wirtspflanzen welkeartige Schädigungen auslösen; sie sind zum Teil von erheblicher praktischer Bedeutung (z. B. GÄUMANN und JAAG, 1946). Das für diese Arbeit als Beispiel dienende *Fusarium lycopersici* Sacc. (z. B. WHITE, 1927; HAYMAKER, 1928; GOTTLIEB, 1944; GÄUMANN, 1951) infiziert die Tomatenwurzeln vom Boden her und wächst durch die Gefäße von Stengeln und Blattstielen nach oben; seine toxischen Stoffwechselprodukte lassen die Tomaten erkranken (Bräunung der Gefäße, Vergilben und Welken der Blätter, Nekrosen, Welken von Blattstielen und Stengeln, Absterben der Pflanzen).

Der Krankheitsverlauf hängt im einzelnen von der Tomatensorte und vom Pilzstamm ab. Zwischen verschiedenen Tomatensorten bestehen Unterschiede in der Widerstandsfähigkeit gegen einen bestimmten Pilzstamm, und zwischen verschiedenen Stämmen des Erregers bestehen Unterschiede in der Pathogenität für eine bestimmte Sorte. Die Leistungen des Parasiten lassen sich gliedern in die Fähigkeit, in den Wirt einzudringen (Infektion), sich im Wirt auszubreiten (Generalisation) und diesen krank zu machen (Pathogenität); dementsprechend unterscheiden wir auf seiten des Wirtes Infektionsresistenz, Generalisationsresistenz und Erkrankungsresistenz (GÄUMANN, 1951a).

Versuchsfrage: Wie verläuft die durch das *Fusarium lycopersici* verursachte Welkekrankheit der Tomaten bei verschiedenen Erreger-Wirt-Kombinationen?

Es gelangten hier die folgenden sechs Tomatensorten zur Prüfung, die uns zur Hauptsache von Dr. S. P. DOOLITTLE und Dr. W. S. PORTE von der Plant Industry Station in Beltsville Md. zur Verfügung gestellt wurden:

| | |
|---|---|
| Bonny Best | sehr anfällig |
| Tuckswood, Rutgers, Marglobe | mittel anfällig |
| Pan America | ziemlich widerstandsfähig |
| Red Currant (*Lycopersicum pimpinellifolium* [Jusl.] Mill. = *Solanum racemigerum* Lange) | sehr widerstandsfähig |

Die Tomaten wurden im Gewächshaus gezogen und im Alter von einem Monat nach der Methode von WELLMAN (1939) infiziert; sie waren dabei 10 bis 20 cm hoch und trugen drei bis vier Blätter. Die einzelnen Pflanzen wurden ausgestochen, in eine Suspension von Myzel und Konidien des betreffenden Pilzstammes getaucht (die Kontrollen in Wasser) und wieder eingepflanzt. Wenn die Blätter sofort nach dem Umpflanzen mit Wasser übersprüht und einige Zeit feucht gehalten werden, macht das Anwachsen im allgemeinen keine Schwierigkeiten. Die Pilzsuspensionen wurden aus fünf Tage alten Kulturen auf RICHARD-Lösung (S. 366) durch Abgießen des Kulturfiltrates und Zerkleinern des Myzels in sterilem Wasser mit einem Mixgerät hergestellt. Zur Verwendung kamen die drei Stämme R-5-6 (stark pathogen), 280 (intermediär) und 257 (schwach pathogen); (S. 365).

Ergebnis drei Wochen nach Infektion:

Die mit dem pathogenen Stamm R-5-6 infizierten Bonny-Best-Tomaten sind gegenüber allen anderen Pflanzen im Wachstum stark zurückgeblieben. Sie zeigen braun verfärbte, von Hyphen durchzogene Stengelgefäße und stark vergilbte Blattspreiten; einzelne Blattstiele sind zu einem schwarzbraunen Faden zusammengeschrumpft und tragen nur noch dürre Reste der Spreite. Alle andern Pflanzen weisen noch keine Symptome auf.

Ergebnis vier Wochen nach Infektion:
Bonny Best

Von 40 mit dem Stamm R-5-6 infizierten Pflanzen haben sich sechs noch relativ gut erhalten und tragen nur unten am Stengel vergilbte und dürre Blätter. Alle übrigen sind stark geschädigt (die meisten Blätter braun und nekrotisch-dürr; Blattstiele fadendünn herabhängend, bei der geringsten Berührung vom Stengel abfallend), und von einem Viertel aller Pflanzen ist nur ein brauner, schlaffer Stengel mit einzelnen spärlichen Blattresten zurückgeblieben. Das Trockengewicht (unter Einbeziehung der vorzeitig abgefallenen Blätter) erreicht im Durchschnitt nicht einmal die Hälfte von demjenigen der Kontrollen. Die Gefäße sind allgemein, auch in den zuerst genannten Fällen, bis in die obersten Blattstiele hinauf braun verfärbt und dicht von Pilzhyphen durchwachsen. Aus steril entnommenen Gewebestücken von Wurzeln, Stengeln und Blattstielen läßt sich der Pilz leicht und regelmäßig rückisolieren.

Die mit dem schwach pathogenen Stamm 257 infizierten Pflanzen sind von den Kontrollen kaum zu unterscheiden; nur an vereinzelten Blättern finden sich nekrotische Fiederspitzen. Die Gefäße des Stengels erscheinen gesund, frei von braunen Verfärbungen und Pilzmyzel. Nur die unteren Wurzelteile sind außen und innen braun verfärbt, und braune Einlagerungen füllen in diesem Bereich zahlreiche Gefäße aus. Die nicht infizierten Kontrollen weisen nur vereinzelte braune Stellen (vor allem an den Seitenwurzeln) auf. Die Rückisolierungen aus der Wurzel gelingen praktisch immer, diejenigen aus dem Stengel zum Teil.

Der intermediäre Stamm 280 löst etwas stärkere Erkrankungen aus als der schwach pathogene (vergilbte Blätter mit nekrotischen Fiederspitzen); doch verhalten sich die Stämme 280 und 257 bei allen Sorten (und auch in den später zu schildernden Versuchen über die Toxinproduktion) nicht wesentlich verschieden.

Marglobe

Die Symptome an den mit R-5-6 infizierten Pflanzen sind ähnlich wie bei Bonny Best, jedoch schwächer ausgeprägt (fädige, braune Blattstiele, Spreiten gelb-braun, dürr und nekrotisch). Die Gefäße sind von der Wurzelspitze bis in die Blattstiele braun verfärbt und von Hyphen durchzogen; der Pilz läßt sich aus allen diesen Teilen leicht rückisolieren.

Infektionen mit den Stämmen 280 und 257 rufen die gleichen Erscheinungen hervor wie bei Bonny Best.

Rutgers und Tuckswood

Diese beiden Sorten verhalten sich wie Marglobe; bei Infektionen mit Stamm R-5-6 sind die Auswirkungen etwas schwächer.

Pan America

Keine Pflanzen dieser Sorte zeigen Erkrankungen an den oberirdischen Organen; nur die unteren Wurzelpartien sind innen und außen braun verfärbt. Rückisolierungen aus Wurzeln und Stengeln gelingen praktisch bei allen Pflanzen, jedoch nur bei einem Teil der aus einer bestimmten Pflanze entnommenen Proben.

Red Currant

Auch bei dieser Sorte bilden die braunen Verfärbungen der unteren Wurzelteile die einzige sichtbare Folge der Infektion mit jedem der drei Stämme. Die Erreger lassen sich aus der Wurzel, jedoch nicht aus dem Stengel rückisolieren.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Die Wurzeln aller verwendeten Tomatensorten zeigen nach Infektion mit allen geprüften Stämmen außen und innen mehr oder weniger starke braune Verfärbungen und Einlagerungen; in allen Fällen läßt sich der Erreger durch steriles Herausschneiden von Gewebestücken aus den Wurzeln rückisolieren. Die Infektion kommt also bei allen Kombinationen zum Haften.

2. Krankheitserscheinungen treten in einem wesentlichen Ausmaß nur bei den mit dem stark pathogenen Stamm R-5-6 infizierten Pflanzen von Bonny Best, Marglobe, Rutgers und Tuckswood auf. Der Erreger hat sich hier bis in die Blätter hinauf ausgebreitet; er läßt sich in den braun verfärbten Gefäßen leicht mikroskopisch nachweisen und rückisolieren.

3. Bei den übrigen Kombinationen beschränken sich die Symptome auf die genannten Bräunungen der Wurzel; Hyphen lassen sich nicht nachweisen. Der Erreger gelangt somit nicht zur Ausbreitung. Trotzdem

lassen sich die drei Stämme aus einem Teil der geprüften Stengelstücke (außer denjenigen von Red Currant) rückisolieren, doch wachsen sie wesentlich langsamer an als in den unter 2 genannten Fällen mit deutlicher Erkrankung. Es werden offenbar einzelne Konidien im Transpirationsstrom aus der Wurzel in den Stengel verfrachtet, wo sie liegenbleiben, ohne sich entwickeln zu können.

Die Pathogenese bei den verschiedenen Kombinationen ist demnach charakterisiert durch die unterschiedliche Fähigkeit des Erregers, sich im Wirt auszubreiten. Es überschneiden sich dabei zwei Probleme:

a) die unterschiedliche Resistenz verschiedener Wirtssorten gegen einen bestimmten Erregerstamm und
b) die unterschiedliche Pathogenität verschiedener Erregerstämme für eine bestimmte Wirtssorte.

Es ist von vornherein zu erwarten, daß diese Vorgänge durch das Zusammenspiel mehrerer Faktoren gesteuert werden; doch kann eine Untersuchung nur bestimmte Aspekte herausgreifen. Für einen von der Wirtspflanze gebildeten Stoff wie das Tomatin sind vor allem zwei Wirkungsmöglichkeiten zu prüfen:

1. könnte die Hemmungswirkung des Tomatins auf die einzelnen Erregerstämme verschieden stark sein (2. Kap.); und
2. könnten die Tomatensorten (in Korrelation zu ihrer Krankheitsresistenz) verschieden große Mengen an Tomatin enthalten (3. Kap.).

## 2. Kapitel

### Wirkungen des Tomatins auf *Fusarium lycopersici* und andere Pilze

Die Wirkungen der Alkaloide auf Pilze (Beeinflussung der Sporenkeimung, Hemmung oder Förderung des Myzelwachstums usw.) sind entsprechend der mannigfaltigen chemischen Natur dieser Stoffe qualitativ und quantitativ sehr verschieden. So beträgt z. B. die Konzentration, die das Wachstum von *Phymatotrichum omnivorum* (Shear) Duggar auf Nährlösung vollständig hindert, bei Sanguinarin $7.10^{-6}$ molar, bei Solanin dagegen $10^{-2}$ molar, also über 1000mal mehr; bei Aconitin ist bei $10^{-2}$ molar praktisch keine Wirkung festzustellen (Greathouse und Rigler, 1940; hier weitere Literatur).

Es sollen im folgenden einige Zahlen mitgeteilt werden, welche die Wirkungen von Tomatin und Solanin (vgl. Tab. 3) auf *Fusarium lycopersici* und einige andere Pilze charakterisieren; eine genaue Analyse ihrer Natur würde ausgedehnte Versuche und Vergleiche mit anderen Stoffen erfordern und liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit. Das Aglykon Tomatidin ist (mindestens als reine Substanz) wenig wasserlöslich; es erwies sich in Sporenkeimungstesten und Wachstumsversuchen mit verschiedenen Pilzen als unwirksam.

## A. Wirkungen auf die Sporenkeimung

Zur Prüfung ihrer Empfindlichkeit für Tomatin und Solanin wurden einige Pilze ausgewählt, deren Sporen in destilliertem Wasser zu einem möglichst hohen Prozentsatz keimen. Sie bildeten alle auf Malzagar (2 % Agar, 2 % Malzextrakt) in siebentägiger Kultur bei 24 ° C reichlich Sporen. Die Verdünnungsstufen der zu testenden Toxinlösung (1, 1/2, 1/4 usw.) wurden mit dem gleichen Volumen Sporensuspension (100 000 Sporen/ccm in destilliertem Wasser) nochmals auf die Hälfte verdünnt; die Konzentration im Keimtropfen betrug also 50 000 Sporen/ccm. Von den einzelnen Stufen wurden Tropfen auf Objektträger pipettiert, in feuchten Schalen während rund 15 Stunden bei 24 ° C inkubiert und ausgezählt. Aus dem Prozentsatz der in den verschiedenen Stufen gekeimten Sporen ergab sich die $LD_{50}$, d. h. diejenige Konzentration der zu prüfenden Substanz, welche die Sporenkeimung im Vergleich zur Kontrolle auf die Hälfte herabsetzt. Die Methoden der Sporenkeimungsteste sind z. B. bei BLUMER und KUNDERT (1950; hier weitere Literatur) und KOBEL (1951) eingehend beschrieben; es erübrigt sich daher, auf die verschiedenen Rechnungsverfahren usw. näher einzugehen.

Die Wirkung einer Substanz wird auf diese Weise vielfach nur teilweise erfaßt. Sie kann sich z. B. auch in einer Verzögerung der Keimung oder in einer Verkürzung oder Deformation der Keimschläuche äußern. Diese Effekte sind jedoch schwer zahlenmäßig auszudrücken und einer starken Streuung unterworfen. Auch die $LD_{50}$-Werte zeigen gewisse Schwankungen; die Tabelle 1 gibt mittlere Werte aus mehreren Parallelen.

*Tabelle 1*

Lage der $LD_{50}$ von Tomatin und Solanin für die Sporenkeimung einiger Pilze in destilliertem Wasser

| Stamm | Nr. E. T. H. | Tomatin molar | Solanin molar |
|---|---|---|---|
| *Trichothecium roseum* Link | 145 | $1.10^{-5}$ | $2.10^{-4}$ |
| *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. | 4874 | $2.10^{-5}$ | $2.10^{-4}$ |
| *Sclerotinia fructigena* Schroet. | 4578 | $3.10^{-5}$ | $8.10^{-5}$ |
| *Botrytis allii* Munn. | 5016 | $2.10^{-4}$ | $2.10^{-4}$ |
| *Alternaria tenuis* auct. | 5878 | $2.10^{-3}$ | $6.10^{-4}$ |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. R-5-6 | 5412 | $2.10^{-3}$ | $2.10^{-3}$ |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. 280 | 5413 | $2.10^{-3}$ | $2.10^{-3}$ |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. 257 | 5414 | $2.10^{-3}$ | $2.10^{-3}$ |

Die drei Stämme von *Fusarium lycopersici*, die hier in erster Linie interessieren, sind für Tomatin und Solanin wenig empfindlich. Die Keimung ihrer in diesen Testen verwendeten Mikrokonidien erleidet bei starken Alkaloidkonzentrationen eine gewisse Verzögerung; sie wechselt im Ausmaß und fehlt unter Umständen ganz. Die Keimtropfen müssen deshalb etwa 40 Stunden inkubiert werden; nach dieser Zeit ist bis zur Tomatinkonzentration von $10^{-3}$ molar keine Beeinträchtigung der Keimung festzustellen. Verdünnung der Sporensuspension bis auf ein Hundertstel ändert

diese Ergebnisse nicht. Werden als Keimungslösung verdünnte Preßsäfte von Tomatenpflanzen, aus dem Stengel abgezapfte Blutungssäfte oder verdünnte Nährlösungen verwendet, so keimen die Sporen ohne Verzögerung (also innerhalb 15 Stunden) bis zu einer Tomatin- und Solaninkonzentration von $10^{-2}$ molar (etwa 10 g/L) ohne Unterschied gegenüber den Kontrollen.

Die übrigen Pilze der Tabelle 1 sind gegen Tomatin und Solanin empfindlicher; die $LD_{50}$ liegt im besten Fall bei $10^{-5}$ molar und damit im Wirkungsbereich der gebräuchlichen Fungizide; der gleiche Schwellenwert gilt z. B. auch für Kupfersulfat bei *Fusarium solani*, *Fusarium lycopersici* und *Alternaria tenuis*. *Fusarium lycopersici* spricht also auf etwa die gleiche Kupfersulfat-Konzentration an wie *Fusarium solani*, dagegen erst auf die hundertfache Konzentration an Tomatin.

Diese Zahlen wurden an Keimversuchen in destilliertem Wasser erhalten und gelten (wie bereits angedeutet) nicht unbedingt, wenn neben dem Toxin noch weitere Stoffe in der Lösung vorhanden sind. Preßsäfte von Tomatenpflanzen, Nährlösungen in verschiedenen Konzentrationen, Hefenextrakt usw. können die Toxizität mehr oder weniger stark erniedrigen; so liegt z. B. die $LD_{50}$ für Tomatin bei *Fusarium solani* in $^1/_{10}$ konzentrierter Richard-Lösung (Seite 366) rund eine, in unverdünnter Richard-Lösung zwei Zehnerpotenzen über dem Wert der Tabelle 1. Die Tomatinwirkung wird auch durch Rutin und Quercetin abgeschwächt (Ma und Fontaine, 1948); desaktivierende Einflüsse verschiedener Kationen und Gerbstoffe auf Kupfersulfat haben z. B. Biedermann und Müller (1951) beschrieben.

Aus diesen und anderen methodischen Gründen lassen sich Vergleichszahlen nicht ohne weiteres aus der Literatur übernehmen; doch geben sie immerhin einen Begriff von der Größenordnung der Wirksamkeit anderer Substanzen. So liegen die Schwellenwerte für zwei weitere Fungizide im Bereich der oben genannten für Kupfersulfat: Oxychinolinsulfat hemmt die Sporenkeimung von *Botrytis cinerea* Pers. bei etwa $10^{-5}$ molar (Blumer und Gondek, 1946), und die entsprechenden Werte für Sublimat bei einem Dutzend verschiedener Pilze schwanken zwischen $10^{-6}$ und $10^{-5}$, also in ziemlich engen Grenzen (Brian und Hemming, 1945).

Die Spektren einiger Antibiotica zeigen eine große Schwankungsbreite mit spezifisch starker Wirkung auf einzelne Pilze. So vermag das aus Kulturfiltraten von *Trichoderma viride* Pers. isolierte Viridin die Sporenkeimung bei *Fusarium coeruleum* (Lib.) Sacc. noch in der Verdünnung von $10^{-8}$ molar zu unterdrücken (Brian, Curtis, Hemming und McGowan, 1946); andere Pilze reagieren ungefähr gleich oder etwas weniger als auf Sublimat, und die Konidien von *Trichoderma viride* selbst keimen in $10^{-4}$ molarer Lösung noch unbehindert. Ähnliche, etwas schwächer ausgeprägte Verhältnisse zeigen Gliotoxin (produziert von *Trichoderma viride* und anderen Pilzen; z. B. Brian und Hemming, 1945), Glutinosin (*Metarrhizium glutinosum* S. Pope; Brian, Curtis und Hemming, 1947), Gladiolsäure (*Penicillium gladioli* Mach.; Brian, Curtis und Hemming, 1948) und Alternariasäure (*Alternaria solani* (E. et M.) J. et Gr.; Brian, Curtis, Hemming, Jefferys, Unwin und Wright, 1951).

Tomatin beeinflußt nicht nur den Keimungsvorgang, sondern auch die Weiterentwicklung der Keimschläuche; es kann für sich allein oder zusammen mit anderen Stoffen Verkrüppelungen und Verkrümmungen der Hyphen, abnorme Verzweigungen usw. auslösen. Solche Bildungen sind z. B. von SCHMIDT (1933) für Solanin und *Trichothecium roseum* Link beschrieben worden; sie erinnern an die Haustorien parasitischer Pilze (vgl. GÄUMANN, 1951 a, S. 430). Ähnliche Wirkungen können auch durch Antibiotica hervorgerufen werden, so durch Griseofulvin (= curling factor; BRIAN, CURTIS und HEMMING, 1946; BRIAN, 1949) und Alternariasäure. Die Bearbeitung der hier angedeuteten Probleme muß späteren Untersuchungen überlassen werden.

## B. Wirkungen auf das Myzelwachstum

Versuchsfrage: Bei welcher Konzentration an Tomatin oder Solanin wird das Myzelwachstum verschiedener Pilze geschwächt oder verhindert?

Die in der Tabelle 2 zusammengestellten Pilze wurden auf Nährlösungen mit abgestuften Tomatin- und Solaninmengen kultiviert. Die beiden Alkaloide verändern sich in der Hitze nicht; sie konnten ohne Änderung der Ergebnisse vor oder nach der Sterilisation zugegeben werden. Die Beimpfung erfolgte möglichst gleichmäßig mit jungen Myzelstücken oder mit Aufschwemmungen von Sporen und Myzelfragmenten. Parallelversuche zeigten auch bei verschieden starker Beimpfung gut übereinstimmende Resultate. Eine Differenzierung der Alkaloidwirkung auf die verschiedenen Altersstufen des Pilzmyzels usw. (vgl. BLUMER und GONDEK, 1946) wurde nicht vorgenommen.

*Tabelle 2*

Vollständige und teilweise Hemmungswirkung des Tomatins auf das Myzelwachstum einiger Pilze in RICHARD-Lösung (S. 366) der Konzentration 1/10 und 1/1 (Tomatin $10^{-2}$ molar = 1 : 100)

| Stamm | Nr. E.T.H. | wachstumshemmende Tomatinkonzentration (molar) in RICHARD-Lösung der Konzentration | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 1/10 | | 1/1 | |
| | | ganz | teilweise | ganz | teilweise |
| *Fusarium solani* (Mart.) A. et Wr. | 4874 | $2.10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ |
| *Sclerotinia fructigena* Schroet. | 4578 | | | | |
| *Trichothecium roseum* Link | 145 | | | | |
| *Cladosporium fulvum* Cooke | 4374 | $>10^{-2}$ | $5.10^{-3}$ | $>10^{-2}$ | $10^{-2}$ |
| *Gloeosporium fructigenum* Berk. | 5002 | | | | |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. R-5-6 | 5412 | $>10^{-2}$ | $>10^{-2}$ | $>10^{-2}$ | $>10^{-2}$ |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. 280 | 5413 | | | | |
| *Fusarium lycopersici* Sacc. 257 | 5414 | | | | |
| *Saccharomyces ellipsoideus* Hs. | 101 | | | | |

Alle untersuchten Pilze vermögen auch bei hohen Alkaloidkonzentrationen noch zu wachsen. Bei einem Tomatingehalt von $10^{-3}$ molar und darunter konnte in keinem Fall (auch nicht bei Kontrollversuchen mit anderen, teilweise noch stärker verdünnten Nährlösungen) eine vollständige Unterdrückung des Wachstums festgestellt werden. Wie bei den Sporenkeimungstesten ist die Tomatinwirkung in verdünnten Nährlösungen stärker; es liegen z. B. die Konzentrationen, welche Wachstum und Farbstoffbildung des *Fusarium solani* noch zu vermindern vermögen (Tabelle 2), rund gleich hoch wie die früher genannten $LD_{50}$-Werte der Sporenkeimung in derselben Nährlösung. Solanin wirkte ähnlich, doch allgemein schwächer; nur eine $10^{-2}$ molare Lösung in $^1/_{10}$ Richard vermochte das Wachstum von *Trichothecium roseum* ganz zu verhindern; bei den anderen Stämmen zeigte sich höchstens eine Verzögerung oder Schwächung des Wachstums. Diese Zahlen sind vergleichbar mit denjenigen von Greathouse und Rigler (1940); in jenen Versuchen hemmte Solanin (in einer anderen Nährlösung von etwas höherem Salzgehalt als $^1/_{10}$ Richard) das Wachstum eines Pilzes bei $10^{-3}$ molar, das der sechs anderen bei $10^{-2}$ molar oder nicht einmal hier. Empfindlicher gegen die Tomatenalkaloide sind gewisse Dermatophyten; so wächst z. B. *Microsporum audouini* Gruby bei einer Solanin- oder Demissinkonzentration von $10^{-4}$ molar oder bei einer Tomatinkonzentration von $10^{-5}$ molar nicht mehr (Kuhn, Löw und Gauhe, 1950).

Auf die von Greathouse und Rigler ermittelte höhere Toxizität einzelner Alkaloide (bis unterhalb $10^{-5}$ molar wachstumshemmend) wurde bereits am Anfang dieses Kapitels hingewiesen. Die meisten der von diesen Autoren geprüften Substanzen wirken freilich schwächer, und viele davon vermögen den Testpilz *Phymatotrichum omnivorum* auch in $10^{-2}$ molarer Lösung nur teilweise zu hemmen. Einige ältere, in der gleichen Arbeit zitierte Befunde fügen sich diesem Rahmen ein: bei verschiedenen Alkaloiden wirken auch hohe Konzentrationen nicht unbedingt wachstumshemmend, sondern teilweise indifferent oder stimulierend. Dies schließt die Möglichkeit nicht aus, in weiteren Untersuchungen an dieser Stoffgruppe spezifisch hohe Wirkungen auf Pilze zu finden; unsere Kenntnisse sind ja hier noch sehr lückenhaft.

In ähnlichen Dimensionen wirken einige auf ihre pilzwidrigen Eigenschaften geprüfte Antibiotica. Die wachstumshemmende Konzentration variiert beim Patulin für eine Anzahl pflanzenpathogener Pilze von $10^{-5}$ molar bis über $10^{-3}$ molar (Gilliver, 1946; vgl. Gäumann, 1951 a, S. 144—146), beim Actidion (Antibioticum aus *Streptomyces griseus* [Kr.] W. et H.) von $10^{-6}$ molar bis gegen $10^{-3}$ molar (Whiffen, 1950); doch gehen bei diesen Versuchen die Wirkungen auf die Sporenkeimung und auf das Myzelwachstum ineinander über. Auch Oxychinolin hemmt in diesen Konzentrationen (rund $5.10^{-6}$ molar bei jungen Myzelien von *Botrytis cinerea* Pers., gegen $10^{-4}$ molar bei älteren; Blumer und Gondek, 1946). Das Wachstum junger Myzelien wird also hier bei geringeren Konzentrationen unterdrückt als die Sporenkeimung; bei den auf Tomatin geprüften Pilzen liegen die beiden Schwellen (in gleicher Nährlösung) ungefähr gleich hoch.

Die Wirkung des Tomatins auf zwei zur Orientierung geprüfte Bakterien erwies sich als gering; *Escherichia coli* (Mig.) Cast. und *Staphylococcus aureus* Rosenb. wurden durch eine Konzentration von $5.10^{-3}$ molar (in Bouillon) am Wachsen gehindert. Diese schwache antibakterielle Wirkung und auch die schwache Wirkung gegen das *Fusarium lycopersici* stehen im Einklang mit den Resultaten von FONTAINE, IRVING, MA, POOLE und DOOLITTLE (1948).

Aus Tabelle 2 geht im besonderen hervor, daß das *Fusarium lycopersici* auch durch Tomatin $10^{-2}$ molar im Wachstum nicht geschwächt wird; wenn (in dieser Versuchsanordnung) eine Hemmung überhaupt erreicht werden kann, müßten dafür Konzentrationen aufgewendet werden, die biologisch nicht mehr interessant erscheinen. Kontrollversuche mit anderen Nährlösungen (verdünnte Preßsäfte von Tomatenstengeln, Blutungssäfte usw.) bestätigen dieses Ergebnis. Auf Grund der schwachen Wirkung in den Versuchen dieses Kapitels erscheint eine Resistenzwirkung des Tomatins wenig wahrscheinlich.

Im Gegensatz zu den auf eine Hemmung gerichteten Erwartungen verursachten Tomatin- und Solaninkonzentrationen von $10^{-2}$ molar (mindestens in den genauer geprüften Kulturen auf RICHARD-Lösung) eine ausgeprägte Wachstumssteigerung, bei der vor allem die oberflächenaktiven Eigenschaften und die Zuckerkomponente des Glykosids eine Rolle spielen mögen. Im Filtrat älterer Kulturen konnte mit den üblichen Methoden kein Alkaloid (Glykosid und Aglykon) mehr nachgewiesen werden; wieweit und unter welchen Bedingungen es vom Pilz abgebaut oder verwertet werden kann, ist noch nicht bekannt.

## 3. Kapitel

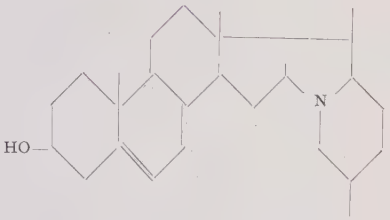
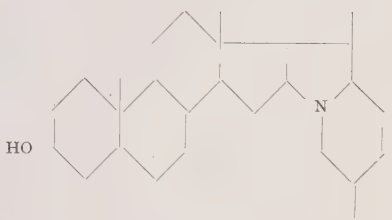
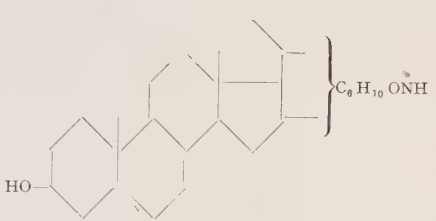
## Der Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten

### A. Allgemeines

Zahlreiche Tomatensorten, darunter auch die in dieser Arbeit genannten, enthalten Tomatin, das Glykosid eines Steroid-Alkaloids von noch nicht vollständig aufgeklärter Konstitution. In anderen *Solanum*-Arten kommen mehrere nahe verwandte Verbindungen vor, die teilweise nur ungenau charakterisiert sind (z. B. SEKA, 1933, S. 681—684, 745—746; HENRY, 1939, S. 642—650; BOIT, 1950, S. 308—315); drei der besser bekannten Vertreter dieser Gruppe sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Zur Isolierung des in dieser Arbeit verwendeten Tomatins dienten zur Hauptsache Blätter der Tomatensorte Tuckswood. Von dem im Gewächshaus gezogenen, etwa drei Monate alten Pflanzen wurden die Blätter abgeschnitten, zerkleinert, im Thermostaten bei 50 bis 60° C getrocknet und durch ein feines Sieb pulverisiert. Die Aufarbeitung erfolgte nach der von KUHN und LÖW (1947) für die Isolierung von Demissin angewandten Methode: Extraktion des Blattmaterials mit Essigsäure 2 %, Fällung der rohen Substanz mit konzentriertem Ammoniak und Kristallisation des reinen Glykosids aus Me-

*Tabelle 3* Alkaloid-Glykoside aus *Solanum*-Arten

| Glykosid<br>Mol.gew. | Solanin (Solanin t)<br>$C_{45}H_{73}O_{15}N$<br>868,04 | Demissin (Solanin d)<br>$C_{50}H_{83}O_{20}N$<br>1018,2 | Tomatin<br>$C_{50}H_{83}O_{21}N$<br>1033,6 |
|---|---|---|---|
| Zucker | 1 Mol. Glukose<br>1 Mol. Galaktose<br>1 Mol. Rhamnose | 2 Mol. Glukose<br>1 Mol. Galaktose<br>1 Mol. Xylose | 2 Mol. Glukose<br>1 Mol. Galaktose<br>1 Mol. Xylose |
| Aglykon<br>Mol.gew. | Solanidin<br>$C_{27}H_{43}ON$<br>397,6 | cis-Dihydro-Solanidin<br>$C_{27}H_{45}ON$<br>399,6 | Tomatidin<br>$C_{27}H_{45}O_2N$<br>415,6 |
| Struktur des Aglykons |  |  |  |
| Vorkommen | *Solanum tuberosum*<br>(Kartoffel) | *Solanum demissum*<br>(mexikanische Wildkartoffel) | *Solanum lycopersicum*<br>(Tomate) und verwandte Arten |
| ungefährer Gehalt in % des Trockengewichtes (vgl. Text) | Blätter 0,1—0,6 | Blätter 1—4,7 | Blätter verschiedener Sorten 0,2—1,8<br>*S. Lyc.* var. *pruniforme* 0,74—5 |
| Literatur | Wolf und Duggar, 1946<br>Szpilfogel, 1948 | Kuhn und Löw, 1947 | Kuhn und Löw, 1948<br>Kuhn, Löw und Gauhe, 1950<br>Fontaine, Ard und Ma, 1951<br>Sato, Katz und Mosettig, 1951 |

thanol. Das Glykosid Tomatin und auch das als Vergleichssubstanz verwendete Solanin (Merck) lösen sich mit äquimolarer Salzsäure gut in Wasser; die Aglykone Tomatidin und Solanidin und ihre Hydrochloride sind nur wenig wasserlöslich.

Für die Betreuung der Tomatenkulturen sei Herrn Obergärtner F. HUMM (Institut für spezielle Botanik E. T. H.), für die Extraktion des Pflanzenmaterials und die Aufarbeitung von Tomatin und Tomatidin Herrn Dr. A. BOLLER vom organisch-chemischen Laboratorium der E. T. H. (Abteilung Prof. Dr. Pl. A. PLATTNER) auch an dieser Stelle der beste Dank ausgesprochen, ebenso Herrn Prof. Dr. V. PRELOG für Solanin- und Solanidinproben und Herrn Prof. Dr. F. KOBEL, Direktor der Eidg. Versuchsanstalt Wädenswil, für die Überlassung von Tomatenblättern.

## B. Bestimmungsmethoden

Die Ermittlung des Tomatingehaltes von Blättern, Stengeln und Wurzeln verschiedener Tomatensorten erfolgte entsprechend den Methoden von WOLF und DUGGAR (1946) für Solanin und von KUHN und LÖW (1947) für Demissin. Bei den Blättern wurden befriedigende Vergleichszahlen erhalten; die in Stengeln und Wurzeln vorhandenen Tomatin- und Tomatidinmengen waren für eine genaue Bestimmung meist zu klein. Doch bestand das Ziel der Analysen nicht in einer Verfolgung des Alkaloidstoffwechsels im allgemeinen, sondern in der Herausarbeitung der für die Resistenzfrage wesentlichen Tatsachen.

Bestimmung des Tomatins: Zur Aufarbeitung gelangt bei 60 bis 70° C im Thermostaten getrocknetes, gemahlenes und nach Trocknung zur Gewichtskonstanz bei 103° gewogenes Material. Die Extraktion erfolgt durch dreimaliges Auskochen mit je 100 ccm Essigsäure 2% pro 10 g trockenes Pulver während fünf Minuten, Abnutschen und Nachwaschen mit 25 ccm des gleichen Lösungsmittels. Alle Essigsäureextrakte werden zusammengegeben, mit Ammoniak auf pH 10 bis 11 eingestellt und 30 Minuten im Wasserbad erwärmt. Der entstehende Niederschlag (Rohextrakt) wird filtriert, getrocknet, fein verrieben und zusammen mit dem Filter in je 100 ccm Methanol pro g Rohextrakt viermal eine Stunde am Rückfluß ausgekocht. Längere Extraktion des Pflanzenmaterials wie des Rohextraktes ergab keine zusätzliche Ausbeute. Die Methanol-Extrakte werden filtriert, vereinigt und zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit Essigsäure 2% während 15 Minuten gekocht, filtriert, mit Ammoniak gefällt wie das erste Mal und der Niederschlag gewaschen, getrocknet und gewogen. Die Kontrolle des Produktes im Sporenkeimungstest mit *Fusarium solani* ergab Aktivitätswerte, die mit denen des umkristallisierten Tomatins im allgemeinen gut übereinstimmten.

Die Prüfung auf Tomatidin geschah nach BRINK und FOLKERS (1951). Durch Extraktion des Essigsäureauszuges mit Äther und Behandlung des Eindampfrückstandes mit Salzsäure konnten in allen Fällen nur Spuren des Aglykons isoliert werden.

## C. Ergebnisse

1. In Wurzeln und Stengeln aller Sorten finden sich Tomatin und Tomatidin nur in so geringen Mengen, daß eine genaue Bestimmung in vielen Fällen nicht möglich war. In unserem Zusammenhang interessieren jedoch vor allem die Höchstwerte; denn es müßte ja, um die Ausbreitung des *Fusarium lycopersici* in Wurzel und Stengel zu verhindern, eine wachstumshemmende (und deshalb auf Grund der geringen Empfindlichkeit des Pilzes hohe) Tomatinkonzentration in Wurzel und Stengel, vor allem in den Gefäßen, vorhanden sein.

Die Werte, die hier erhalten wurden, liegen für Wurzeln und Stengel aller Sorten zwischen 0,04 und 0,2 % des Trockengewichtes und damit im Bereich der von Wolf und Duggar (1946) für Solanin ermittelten Zahlen (0,02 bis 0,2 % in Stengeln, 0,05 bis 0,4 % in Wurzeln verschiedener Kartoffelsorten). Der Solaningehalt der Kartoffelstengel bleibt während der ganzen Vegetationsperiode (pro g Trockengewicht oder pro Pflanze berechnet) ungefähr auf der gleichen Höhe; in den Wurzeln ist er am Anfang ziemlich hoch und nimmt dann bald ab. Bei den Tomaten scheinen die Verhältnisse ähnlich zu liegen.

Ein Tomatingehalt von 0,2 % des Trockengewichtes entspricht einem solchen von rund 0,01 % des Frischgewichtes. Vom Frischgewicht sind rund 95 % Wasser; denkt man sich das gesamte Tomatin in einem Zehntel dieser Menge gelöst, kommt man auf eine Konzentration von rund $10^{-3}$ molar; in einer in Tomatenstengelextrakten oder Blutungssäften hergestellten, zehnmal stärkeren Lösung wächst das *Fusarium lycopersici* in vitro normal oder stärker als in den Kontrollen. Eine solche Tomatinlösung müßte vor allem in den Gefäßen vorliegen; um dies nachzuprüfen, wurden einige Versuche mit Blutungssäften angestellt.

Die den verschiedenen Sorten an der Stengelbasis abgezapften Blutungssäfte hemmen das Wachstum von *Fusarium lycopersici* nicht; auf die Sporenkeimung wirken sie auch in starken Verdünnungen gegenüber Wasser deutlich stimulierend. In den Säften aller Tomatensorten konnte Tomatin nachgewiesen werden in Konzentrationen von rund $10^{-4}$ molar, also unterhalb der Größenordnung, die oben auf Grund der Analysen trockenen Materials errechnet wurde. Diese Zahlen bestärken die am Schluß des zweiten Kapitels geäußerte Vermutung, daß die Resistenz gegen das *Fusarium lycopersici* mit dem Tomatingehalt nicht in Beziehung steht; die Differenz zwischen der in den Gefäßen gefundenen Konzentration von rund $10^{-4}$ molar und der Konzentration von $10^{-2}$ molar, bei der in vitro noch keine Hemmung des Pilzwachstums zu erkennen ist, erscheint groß genug, um einen Schluß auf die Verhältnisse in der Pflanze zu gestatten.

Die in Stengeln und Wurzeln neben dem Glykosid vorhandenen Aglykon mengen sind gering und nach allen Erfahrungen jedenfalls nicht wesentlich höher als der von Brink und Folkers (1951) bei Wurzeln von Rutgers-Tomaten gefundene Wert von 0,013 % des Trockengewichtes.

2. In den Blättern der verschiedenen Sorten kann der Tomatingehalt höhere Werte annehmen; sie lagen in unseren Bestimmungen zwischen 0,2 und 2 % des Trockengewichtes oder 0,02 und 0,2 % des Frischgewichtes. Die höchsten Zahlen wurden bei der Sorte Red Currant erhalten (gegen 2 %); im übrigen zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den geprüften Sorten, insbesondere keine Korrelation zur *Fusarium lycopersici*-Resistenz, die auf Grund des Krankheitsverlaufs auch nicht zu erwarten war. Die Schwankungen des Tomatinspiegels bei einer bestimmten Sorte sind ziemlich stark.

Die Bestimmungen an jungen Pflanzen von etwa vier Wochen ergaben bei allen Sorten durchwegs geringe Tomatinmengen zwischen 0,2 und 0,6 % des Trockengewichtes. Diese Konzentrationen sind gleich wie die von Solanin in Kartoffelblättern (WOLF und DUGGAR, 1946). Bei Kartoffeln bleibt jedoch der Alkaloidgehalt (immer bezogen auf das Trockengewicht) im Laufe des Wachstums in großen Zügen auf der gleichen Höhe; die Schwankungen zeigen (abgesehen von einer Abnahme am Versuchsende) keine bestimmte Tendenz. Trotzdem findet eine Anreicherung in den Blättern statt; der Solaningehalt pro Pflanze steigt z. B. von 50 mg nach einem Monat auf 350 mg nach zwei Monaten, um im folgenden Monat auf 150 mg abzusinken.

In gleicher Weise nimmt der Tomatingehalt der Tomatenblätter zu; die Vermehrung drückt sich nicht nur im Gehalt pro Pflanze, sondern auch in den entsprechenden Werten pro Trockensubstanz aus, die bei Red Currant bis gegen 2 %, bei den anderen Sorten auf rund 1 % oder mehr ansteigen.

3. Nach IRVING (1947) bleibt der Alkaloidgehalt einer resistenten Tomatensorte auch nach der Infektion mit *Fusarium lycopersici* erhalten, während er bei einer anfälligen Sorte mit fortschreitender Erkrankung abnimmt. Dies konnte in unseren Versuchen bestätigt werden. Der Tomatingehalt von Bonny-Best-Pflanzen vier Wochen nach Infektion betrug beim Stamm R-5-6 0,6 % des Trockengewichts oder 2,5 mg pro Pflanze, dagegen beim Stamm 257 und in den Kontrollen 1,2 % des Trockengewichts oder 8 mg pro Pflanze; entsprechend behandelte Pflanzen von Red Currant ergaben bei allen Stämmen die gleichen Werte. Die Verminderung des Alkaloidgehaltes von Bonny Best nach Infektion mit R-5-6 ist verständlich; die Pflanzen sind ja schwer erkrankt, die Blätter braun und nekrotisch und ihr Trockengewicht nur halb, das Frischgewicht weniger als ein Drittel so groß wie dasjenige der Kontrollen.

Die physiologischen Probleme von Bildung, Wanderung und Bedeutung der pflanzlichen Alkaloide sind noch weitgehend umstritten (vgl. MOTHES, 1928, 1950; FREY-WYSSLING, 1938, 1949; DAWSON, 1948; PAECH, 1949, 1950). Bei den großen chemischen Unterschieden innerhalb dieser Stoffgruppe lassen sich experimentelle Befunde nicht ohne weiteres verallgemeinern. Verschiedene Alkaloide, in erster Linie das Nikotin, werden in der Wurzel gebildet, im Transpirationsstrom verfrachtet und in den Blättern angereichert (z. B. MOTHES und HIEKE, 1943; BLANK, 1945; SCHMID, 1948; MOTHES und ROMEIKE, 1950). Beim Tomatin sind diese Vorgänge noch

nicht untersucht worden; nach Mothes (1950) kann Solanin in Blatt und Knolle der Kartoffel gebildet werden, doch möglicherweise aus Vorstufen, die der Wurzel entstammen. Die hier geschilderten vorläufigen Befunde lassen die Vorstellung zu, daß Tomatin mindestens teilweise in der Wurzel gebildet und in den Blättern angereichert wird; wie der Aufbau im einzelnen vor sich geht (Bildung des Aglykons und Aufnahme der vier Zuckermoleküle), müßte noch abgeklärt werden.

## 4. Kapitel

## Die Toxinbildung durch *Fusarium lycopersici* in vitro

Die in den bisherigen Kapiteln mitgeteilten Befunde sprechen gegen eine Bedeutung des Tomatins als Resistenzfaktor im Falle des *Fusarium lycopersici*. Doch lassen solche negativen Ergebnisse immer eine gewisse Unsicherheit zurück; mag es doch sein, daß ein vorhandener Effekt durch die angewandten Methoden lediglich nicht erfaßt wurde. In weiteren Versuchen wurden deshalb noch andere, auf Grund der Erfahrungen weniger wahrscheinliche Möglichkeiten einer Tomatinwirkung in Betracht gezogen, um eventuell neue Gesichtspunkte zu gewinnen. Und schließlich wird man sich nach dem Versagen dieser einen Hypothese naturgemäß nach anderen Lösungen des Resistenzproblems umsehen.

Das *Fusarium lycopersici* bringt (wie auch andere Erreger von Welkekrankheiten) die Tomatenpflanzen durch seine Toxine zum Erkranken. Die Giftwirkung der Gefäßbündelflüssigkeit welkekranker Tomatenpflanzen für gesunde Tomatensprosse wies Gottlieb (1943 a) nach; die Isolierung von Toxinen aus kranken Pflanzen stößt jedoch auf große Schwierigkeiten. Die Welke-Erreger bilden aber auch in Reinkultur toxische Stoffwechselprodukte, welche an Pflanzensprossen Symptome auslösen, die denen erkrankter Pflanzen mehr oder weniger entsprechen; so gelang es beim *Fusarium lycopersici*, bisher zwei Welketoxine zu fassen, nämlich Lycomarasmin und Fusarinsäure (z. B. Boller, 1951; Gäumann, 1951; Gäumann, Naef-Roth und Kobel, 1952; Gäumann, Naef-Roth, Reusser und Ammann, 1952). Es darf damit gerechnet werden, daß sie der Pilz auch in vivo zu bilden vermag. Mit der Toxinbildung in vitro und ihrer Beeinflussung durch Tomatin befassen sich die im folgenden zu schildernden Versuche.

### A. Die Toxigenität verschieden pathogener Stämme

Stark und schwach pathogene Stämme von *Fusarium lycopersici* verhalten sich in vitro verschieden. Die stark pathogenen bilden auf Malzagar reichlich weißes, wolliges Luftmyzel; die schwach pathogenen wachsen hefenartig-schleimig, violett und praktisch frei von Luftmyzel. Die Stämme saltieren zum Teil stark, wobei Myzelbildung und Pathogenität meist abnehmen (Wellman, 1943; hier weitere Literatur).

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme R-5-6 (stark pathogen), 280 (intermediär) und 257 (schwach pathogen) wurden uns seinerzeit von Dr. T. Fontaine vom U. S. Department of Agriculture in Beltsville Md. zur Ver-

fügung gestellt. Alle drei sind gegen Red Currant *(Lycopersicum pimpinellifolium)* apathogen (1. Kap.). Daneben existieren auch Stämme, die selbst diese hoch widerstandsfähige Sorte erkranken lassen (ALEXANDER und TUKKER, 1945; GERDEMANN und FINLEY, 1951); sie konnten hier nicht untersucht werden.

Besteht beim *Fusarium lycopersici* ein Zusammenhang zwischen der Toxigenität in vitro und der Pathogenität in vivo? Wenn ja, wäre zu erwarten, daß ein stark pathogener Stamm entsprechend mehr Toxine bildet als ein schwach pathogener. GÄUMANN, NAEF-ROTH und MIESCHER (1950) verneinten jedoch diese Frage; in ihren Versuchen lieferte der stark pathogene Stamm R-5-6 wenig, der schwach pathogene 257 dagegen viel Lycomarasmin.

Die Erweiterung dieser Befunde stößt auf methodische Schwierigkeiten. Es ist zur Zeit nicht möglich, Lycomarasmin und Fusarinsäure in Kulturfiltraten hinreichend genau und serienmäßig zu bestimmen (ganz abgesehen von weiteren, noch zu isolierenden wirksamen Stoffwechselprodukten). In den vorliegenden Versuchen wurde deshalb die Toxizität der rohen Kulturfiltrate ermittelt; die Kurven der Abbildungen 3 und 4 geben demnach die Gesamtwirkung der zu einer bestimmten Zeit im Filtrat vorhandenen Toxine und Begleitstoffe an.

Versuchsfrage: Wie groß ist die Giftwirkung verschieden alter Kulturfiltrate von drei Stämmen des *Fusarium lycopersici* auf Tomatensprosse?

Die drei Pilzstämme wurden auf RICHARD-Nährlösung (modifiziert nach LUZ, 1934: 50 g Glukose, 10 g Ammonnitrat, 5 g Monokaliumphosphat, 2,5 g Magnesiumsulfat und 0,02 g Ferrichlorid auf einen Liter destilliertes Wasser; Sterilisation im strömenden Dampf während je $1^1/_2$ Stunden an drei aufeinanderfolgenden Tagen) kultiviert. Frühere Versuche hatten Unterschiede bei Verwendung ungleicher Kulturgefäße gezeigt; es kamen deshalb 500-ccm-Erlenmeyer (mit 100 ccm Nährlösung) und 2-Liter-Glaxokolben (mit 500 ccm Nährlösung) zur Verwendung. Für die Herstellung des Impfmaterials wurden fünf Tage alte Reiskulturen (20 g Reis und 40 ccm Wasser, im Autoklaven sterilisiert) mit 100 ccm sterilem Wasser geschüttelt; von dieser Suspension erhielten die Erlenmeyer einen, die Glaxokolben 5 ccm. Die Inkubationstemperatur lag zwischen 22 und 25 ° C; ihre Schwankungen waren für alle Kolben praktisch die gleichen.

Bei jeder Ernte wurde der Inhalt von zehn Erlenmeyern und zwei Glaxokolben pro Pilzstamm in tarierte Faltenfilter gegossen, das Myzel gewaschen (kaltes und siedendes destilliertes Wasser 1 : 1; Erlenmeyer 4 × 50 ccm, Glaxokolben 4 × 100 ccm), über Nacht bei 70 bis 80 ° C und anschließend während vier Stunden bei 103 ° C getrocknet und gewogen. Die Prüfung der Filtrate erfolgte im Welketest und im Sporenkeimungstest gegen *Ustilago zeae*.

Die Methode der Welketeste ist z. B. bei GÄUMANN, NAEF-ROTH und REUSSER (1950) beschrieben. Von den Testpflanzen (im Gewächshaus

gezogene, 20 bis 30 cm hohe Tuckswood-Tomaten) wird ein vierblättriger Gipfelsproß weggeschnitten, gewogen und in die zu testende Lösung gestellt. Nach Aufnahme der gewünschten Dosis werden die Sprosse in Leitungswasser zurückgebracht, am Licht stehengelassen und nach 48 Stunden bonitiert. Bei den hier vorliegenden Kulturfiltraten geschah dies für jedes einzelne Blatt nach folgendem Schema:

0 = keine Symptome
1 = schwache Nekrosen auf meist allen Blättern nur am Rand
2 = wenige nekrotische Flecken auf den Spreiten aller Blätter
3 = mittelgroße nekrotische Flecken auf allen Blattspreiten
4 = Spreiten stark nekrotisch

Der in Abbildung 3 aufgetragene Welke-Index stellt den Durchschnittswert aus zehn Pflanzen, also 40 Einzelblättern dar. In allen hier zu besprechenden Versuchen erhielten die Tomatensprosse eine Dosis von 0,25 ccm des auf 1/5 verdünnten Kulturfiltrates pro Gramm ihres Frischgewichtes; die Aufnahme dieser Menge benötigte im allgemeinen zwei bis sechs Stunden. Die zusammen geernteten Kulturfiltrate kamen immer am gleichen Tage zur Prüfung; zur Kontrolle der Empfindlichkeit des Testmaterials wurde eine frisch hergestellte Lycomarasminlösung mitgeprüft und die Schwankungen dieses Standards bei der Auswertung berücksichtigt.

Die Sporenkeimungsteste wurden in der auf Seite 356 angegebenen Weise ausgeführt. Als Testorganismus diente *Ustilago zeae* (Beckm.) Ung., der Erreger des Maisbrandes. Seine Brandsporen werden jeweils im Herbst gesammelt und im Freien aufbewahrt; sie bewahren das folgende Jahr hindurch eine je nach Herkunft verschieden hohe, zeitweise schwankende Keimkraft von rund 50 bis 80 % (Sporensuspension in Brunnenwasser mit 0,2 % Ascorbinsäure und 0,5 % Sac-

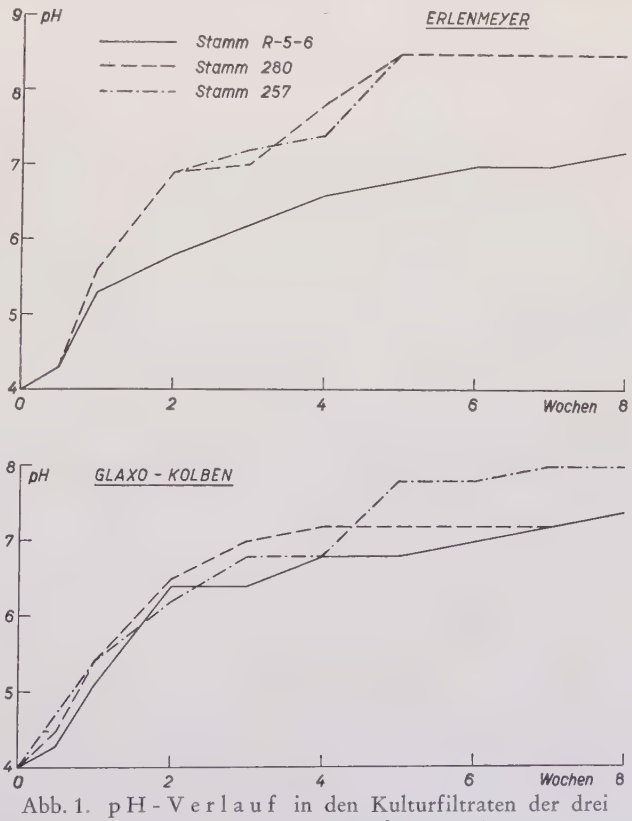



Abb. 1. pH-Verlauf in den Kulturfiltraten der drei Stämme von *Fusarium lycopersici*

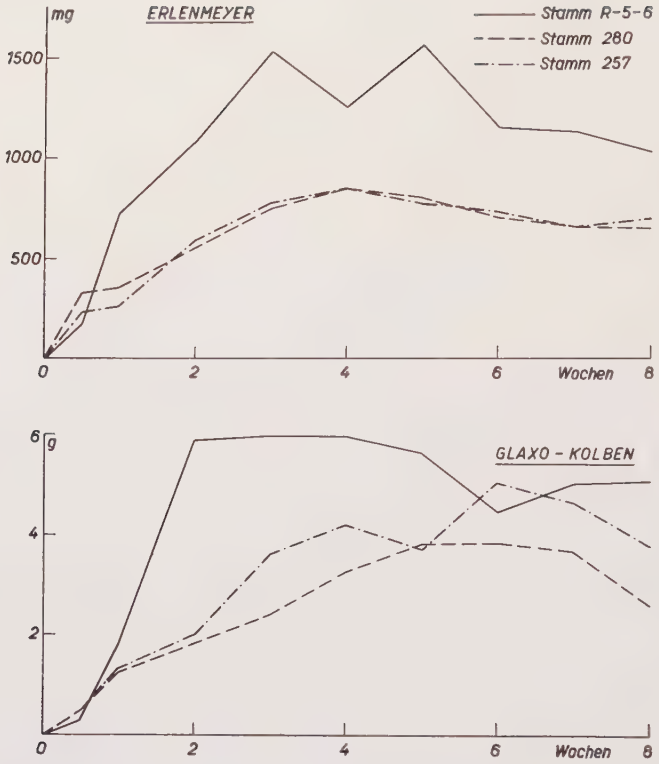



Abb. 2. Myzelgewichte der drei Stämme von *Fusarium lycopersici*

charose). Diese niedere Keimungsrate ist für einen Testpilz ungünstig; dem gegenüber steht seine im Vergleich zu anderen, an sich praktischeren Testobjekten höhere Empfindlichkeit für verschiedene pilzliche Toxine. Die *Ustilago*-Aktivität einer Lösung wird in Verdünnungseinheiten (E/ccm) angegeben, d. h. durch diejenige Verdünnung der zu testenden Lösung, bei der die Sporen zu 50 % der Kontrolle keimen.

Die pH-Werte der Kulturfiltrate (Abb. 1) stiegen von 4,0 (unbeimpfte, sterilisierte Nährlösung) dauernd an (vgl. LUTZ, 1934) und lagen nach acht Wochen zwischen 7,2 und 8,5. Eine Welkewirkung durch das pH allein trat in diesem Bereich nicht ein; für die *Ustilago*-Teste wurden die alkalischen Lösungen auf pH 6,5 eingestellt.

Den Abbildungen 2 bis 4 können folgende Ergebnisse entnommen werden:

1. Die Stämme 280 (intermediär) und 257 (schwach pathogen) verhalten sich untereinander praktisch gleich, aber deutlich verschieden vom stark pathogenen Stamm R-5-6. Dies entspricht dem Verlauf der Infektionsversuche; auch dort ging der Stamm 280 mit dem Stamm 257 im wesentlichen parallel.
2. Das Myzelgewicht ist beim Stamm R-5-6 fast durchwegs (in den Glaxoversuchen besonders am Anfang) deutlich größer als bei den zwei anderen Stämmen. Auffällig ist der rasche Anstieg des Myzelgewichtes von R-5-6 in den Glaxokolben, wo es schon nach zwei Wochen bei etwa 6 g sein Maximum erreicht, um anschließend konstant zu bleiben oder leicht abzufallen. Die beiden anderen Stämme produzieren nach zwei Wochen nur ein Drittel dieser Menge, wachsen aber noch weiter bis zum Höchstwert von 4 bis 5 g nach fünf bis sechs Wochen

und gehen anschließend wieder etwas zurück. In den Erlenmeyer-Versuchen erreichen die drei Stämme ungefähr gleichzeitig ihr größtes Myzelgewicht; der Stamm R-5-6 liegt konstant über den beiden anderen. Mit dem stärkeren Wachstum dieses Stammes in Nährlösungen geht die oben erwähnte intensive Myzelbildung auf Malzagar einher.

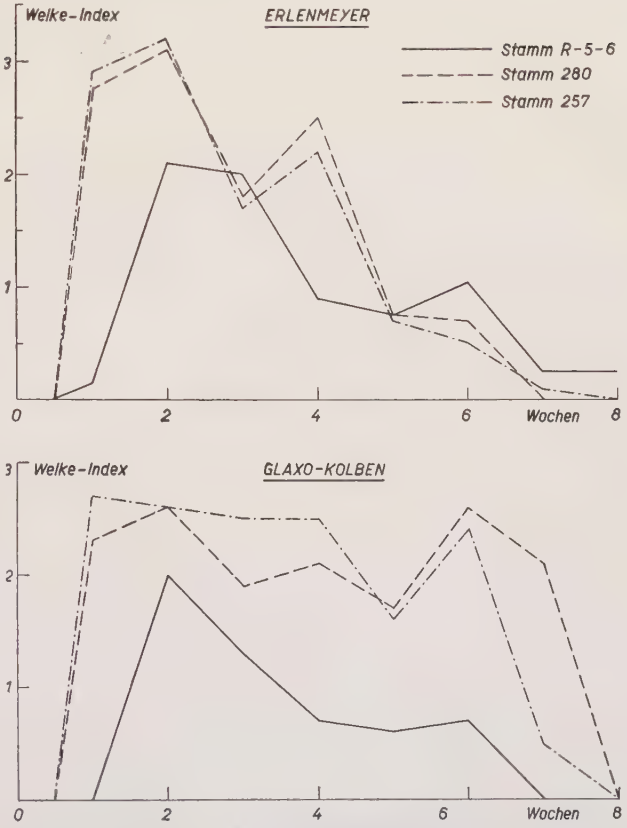



Abb. 3. Welke-Index der Kulturfiltrate (Konzentration 1/5, Dosis 0,25 ccm pro g Testpflanze) bei den drei Stämmen von *Fusarium lycopersici*

3. Die im Welketest bestimmte Toxizität der Kulturfiltrate ist bei den Stämmen 257 und 280 praktisch überall größer als beim Stamm R-5-6. Bei diesem letzteren erreicht sie nach zwei Wochen ein Maximum und fällt anschließend ziemlich rasch ab. Die beiden anderen Stämme erreichen ihre größten Werte nach ein bis zwei Wochen; nur in den Erlenmeyerversuchen folgt darauf ein ähnlicher Rückgang wie beim Stamm R-5-6, während die Glaxo-Kulturfiltrate ihre hohe Wirkung im wesentlichen bewahren und sie erst nach der sechsten Woche rapid verlieren. Über diesen Kurvenverlauf wird noch zu sprechen sein; jedenfalls verhalten sich die Stämme 257/280 und R-5-6 (bei dieser Versuchsanordnung) in Toxinproduktion und Myzelwachstum gerade umgekehrt.
4. Auch die Kurven der *Ustilago*-Aktivität zeigen die stärkere Toxinproduktion der Stämme 257 und 280. Die Unterschiede erscheinen hier größer, doch ist dies mindestens teilweise methodisch bedingt. Die *Ustilago*-Aktivität wird in Verdünnungseinheiten gemessen, und eine Toxizitätsabnahme der Lösung (z. B. durch Verdünnung) auf die Hälfte bewirkt eine Halbierung der Ordinate; der Welke-Index nimmt im gleichen Fall um einen stark veränderlichen Betrag mehr oder weniger linear ab. Die Giftwirkung der Filtrate von Stamm 257 steigt am An-

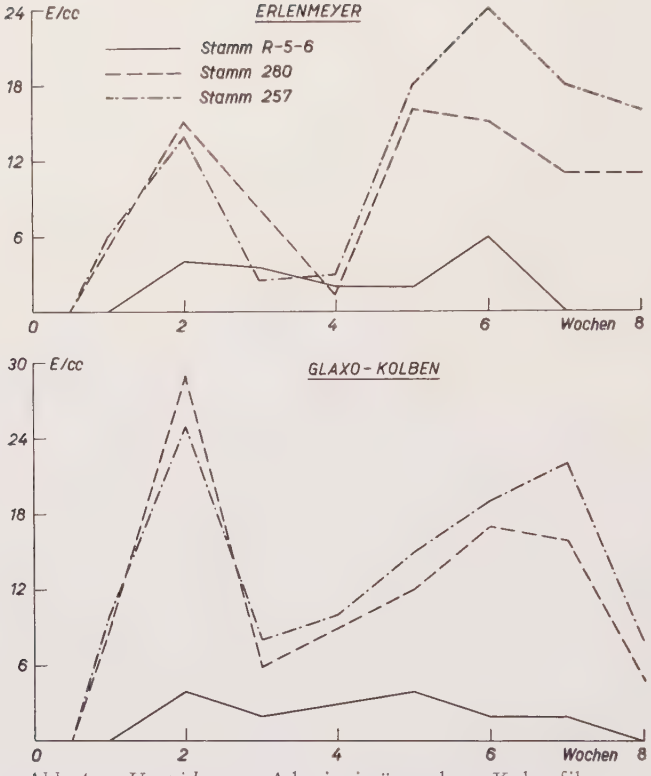



Abb. 4. *Ustilago*-Aktivität der Kulturfiltrate (Verdünnungseinheiten) bei den drei Stämmen von *Fusarium lycopersici*

fang stark an zu einem Maximum nach zwei Wochen; daran schließt sich ein rascher Abfall und ein Wiederanstieg an, der die erste Aktivitätsspitze in den Glaxoversuchen nicht erreicht, sie jedoch in den Erlenmeyer-Versuchen noch übertrifft. Am Schluß wird die Giftwirkung wieder geringer.

5. Die Kurven der Glaxo- und Erlenmeyer-Kulturen verlaufen in den Hauptpunkten gleichsinnig; einige Unterschiede werden noch zu diskutieren sein.

Diese Befunde bestätigen die Erfahrung von GÄUMANN, NAEF und MIESCHER (1950): der stark pathogene Stamm R-5-6 bildet weniger Welketoxine als die schwach pathogenen Stämme. Die Differenz kann aus diesen Versuchen nur grob abgeschätzt werden; Welke-Effekt und Sporenkeimungshemmung kommen durch das Zusammenwirken mehrerer Komponenten zustande und drücken nicht den Gehalt an einem bestimmten Stoff aus. Die Unterschiede in der Welkewirkung erscheinen in Abbildung 3 nicht sehr stark; in einem späteren Versuch (Abb. 5) sind sie noch mehr abgeschwächt und äußern sich mehr im Kurvenverlauf als in der Wirkungshöhe.

Im Welketest mit Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici* erfassen wir vier Komponenten: Lycomarasmin und Fusarinsäure, die beiden bekannten Welkestoffe dieses Pilzes, dazu mindestens ein weiteres, noch zu isolierendes Welketoxin (vgl. 6. Kap.) und schließlich Begleitstoffe, welche die Wirkung der eigentlichen Toxine beeinflussen können, ohne selbst solche zu sein. Das klassische Beispiel dafür ist der Eisen-Lycomarasmin-Komplex, welcher wesentlich giftiger wirkt als reines Lycomarasmin. Die Gesamtwirkung ist also nicht einfach die Summe der Wirkungen einzelner Bestandteile; deshalb mögen die vorliegenden Kur-

ven stärker schwanken als der effektive Gehalt der getesteten Lösungen an Welketoxinen. — In ähnlicher Weise kommt die Wirkung auf die Sporenkeimung zustande; Lycomarasmin ist dabei unwirksam.

Zur Vereinfachung sollen im folgenden nur die Kurven der Stämme R-5-6 und 257 näher besprochen werden; diejenigen von 280 zeigen zusätzlich nichts Neues.

In den ersten zwei Wochen nach der Beimpfung bildet in den Erlenmeyerkolben der Stamm R-5-6 70, der Stamm 257 75% des im höchsten Punkt der betreffenden Kurve vorhandenen Myzels. In den Glaxoversuchen erreicht der Stamm R-5-6 nach zwei Wochen schon sein größtes Myzelgewicht, der Stamm 257 dagegen nur 40% davon; auch dieser letzte Wert ist absolut genommen nicht gering, scheint es aber wegen des relativ hohen Kurvenscheitels. In dieser ersten Wachstumsphase ist das junge, intensiv wachsende Pilzmyzel offenbar besonders zur Toxinbildung befähigt. Die Kurven aller Stämme für Welke- und *Ustilago*-Test erreichen innerhalb dieser zwei Wochen eine mehr oder weniger scharf ausgeprägte Spitze. Mit Ausnahme der *Ustilago*-Teste für die Erlenmeyerversuche, bei denen die Aktivität in einer zweiten Spitze noch höher steigt, ist dieses erste Maximum der Toxizität zugleich der höchste Wert, den die betreffende Kurve in den acht Versuchswochen überhaupt erreicht.

Zum Vergleich seien hier einige andere Versuche herangezogen. Es zeigt z. B. *Botrytis cinerea* Pers. auf Nährlösung mit Glukose und Pektin (Gäumann und Böhni, 1947-I, Fig. 1) in den ersten vier Kulturwochen starkes Wachstum, das in der zweiten Woche besonders intensiv ist; die Produktion der Pektase, eines weitgehend adaptiven Enzyms, folgt dieser Kurve fast parallel: im Bereich stärksten Wachstums ist auch die Pektaseproduktion am größten. Die Bildung der Pektinase, eines konstitutiven, also eines vom Pilz unabhängig vom Substrat stets gebildeten Enzyms, eilt der Wachstumskurve voraus und erreicht ihr Maximum schon nach zehn Tagen, während das Myzelgewicht vier Wochen lang ansteigt. Noch extremer geschieht dies, wenn die Nährlösung nur Glukose enthält (Fig. 3 der genannten Arbeit; Gäumann, 1951 a, Abb. 248); die Pektinase erreicht ihr Maximum schon nach drei Tagen, bevor das Myzelgewicht überhaupt meßbar wird. Starke Pektinasebildung ist offenbar die Voraussetzung für intensives Myzelwachstum; das wachsende Myzel vermag dann (wenn das Substrat Pektin enthält) Pektase aufzubauen. Ähnlich, doch etwas weniger klar liegen die Verhältnisse bei der Enzymproduktion von *Aspergillus niger* v. T. (Gäumann und Böhni, 1947-II).

Die Produktion von Enniatin A, einem im Myzel angereicherten, schwer wasserlöslichen Antibioticum, durch das *Fusarium oxysporum* Schlecht. nimmt einen ähnlichen Verlauf (Gäumann, Naef-Roth und Ettlinger, 1950). Bei der für die Toxinbildung (nicht für das Myzelwachstum) optimalen Temperatur von 30° C erreicht das Myzelgewicht sein Maximum nach 18 Tagen, die Aktivität des Myzelextraktes nach 19 Tagen; anschließend fallen beide

Kurven wieder deutlich ab. Die Toxinproduktion fällt also auch hier mit dem Wachstum zusammen. Bei der suboptimalen Temperatur von 27° C steigt die Aktivität vom Zeitpunkt des größten Myzelgewichts noch etwas an, während das Myzel schon deutlich zurückgeht.

Auch bei *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. sind Myzelwachstum und Toxinbildung im allgemeinen in jungen Kulturen am stärksten (TUREL, 1952). Beide Vorgänge lassen sich durch die Zusammensetzung der Nährlösung weitgehend beeinflussen: Zugabe von Aneurin zur RICHARD-Lösung verursacht in den ersten Tagen eine Wachstumsförderung, später eine Wachstumshemmung und gleichzeitig eine Förderung der (erst in dieser Periode meßbar werdenden) Toxinproduktion. In Gegenwart von Zink erfolgt nur eine Wachstumsförderung am Anfang; die anderen Effekte bleiben aus.

Die hier angedeuteten Zusammenhänge umfassen eine Menge Probleme, die noch zu bearbeiten sind. Die bei den genannten Beispielen zutage tretende Fähigkeit des jungen, intensiv wachsenden Myzels, viel Toxin (oder Enzym) zu bilden, mag in Zusammenhang stehen mit dem Apoplexie-Effekt bei gewissen Welkekrankheiten (vgl. GÄUMANN, 1951 a, S. 562). Es können z. B. in Aprikosenbäumen lange Zeit latente Infekte eines *Valsa*-Pilzes bestehen, ohne den Baum manifest zu schädigen. Plötzlich erfolgt dann im Frühsommer ein schlagartiger Welkezusammenbruch. Nach GÄUMANN und NAEF-ROTH (1950) und GÄUMANN (1951 d) wirken dabei drei Faktoren zusammen: 1. eine Schwächung des Wirtes infolge des Austreibens; 2. eine thermisch bedingte Steigerung von Wachstum und Toxinproduktion und 3. eine thermisch bedingte Steigerung des Wirkungsgrades der pilzlichen Toxine. Von unseren Kurven ausgehend wäre Punkt 2 dahin zu präzisieren, daß der Pilz infolge der Schwächung des Wirtes und infolge der steigenden Temperatur intensiv zu wachsen beginnt und damit gekoppelt in kurzer Zeit große Toxinmengen in den Wirt ausschüttet.

Beim *Fusarium lycopersici* dauert es nach den Infektionsversuchen des ersten Kapitels etwa zehn bis vierzehn Tage bis zum Auftreten der ersten schwachen Symptome und drei bis vier Wochen bis zum endgültigen Krankheitsbild mit starken Welkeerscheinungen überall dort, wo eine sichtbare Erkrankung zustande kommt. In dieser Zeit ist der Erreger durch die Gefäße der Wirtspflanze nach oben gewachsen, hat seine Toxine gebildet und sie zur Wirkung gebracht. Dieser Verlauf stimmt zeitlich mit der ersten Phase der Toxinproduktion in vitro ziemlich überein. Aus anderweitigen Gründen hat jedoch nur der Stamm R-5-6, und auch er nur bei gewissen Tomatensorten, die Möglichkeit, überhaupt zu wachsen und Toxine zu bilden; den anderen beiden Stämmen ist in der Pflanze das Wachstum und damit die Erzeugung von Welkestoffen (die in vitro noch stärker ist als beim Stamm R-5-6) verwehrt.

Nun kehren wir zur Kurvendiskussion zurück. Die zweite Entwicklungsphase, die an das nach rund zwei Wochen erreichte Maximum anschließt, ist schwerer zu überblicken. Die Toxinproduktion

wird von Abbauvorgängen überlagert. Worauf diese beruhen, ist nicht bekannt; eine einfache Beziehung zum pH-Verlauf (Abb. 1) tritt nicht zutage. Die Kurven verlaufen nun im einzelnen verschieden.

Relativ einfach scheinen die Verhältnisse beim Stamm R-5-6 in Glaxokulturen. Das Myzelgewicht bleibt von der zweiten Woche an praktisch konstant und fällt erst gegen Schluß der Kulturperiode leicht ab. In diesem Abschnitt ruhenden Myzelwachstums (summarisch ausgedrückt) geht die Welkewirkung rasch zurück; es wird offenbar kaum mehr Toxin gebildet, aber viel zerstört. Die geringe *Ustilago*-Aktivität bleibt von zwei bis sechs Wochen ungefähr konstant. Das erste Maximum ist hier nur wenig ausgeprägt; es könnte deshalb vermutet werden, daß dieses vor allem auf Lycomarasmin zurückzuführen sei, das nach Aufhören des Myzelwachstums relativ rasch zerstört würde; damit stände im Einklang, daß Gäumann, Naef-Roth und Miescher (1950) bei diesem Stamm nach fünf Wochen nur wenig Lycomarasmin isolieren konnten. Am Ende der Versuchszeit nimmt die Aktivität wieder etwas zu, und zwar gleichzeitig mit einer Abnahme des Myzelgewichtes.

Ähnlich liegen die Dinge beim gleichen Stamm R-5-6 in Erlenmeyerkulturen. Hier wächst das Myzel wesentlich in den ersten drei Wochen, schwankt dann auf etwa derselben Höhe und sinkt nach der fünften Woche ab. Der Welke-Index bleibt nach der zweiten Woche ungefähr konstant und geht nach Abschluß des Myzelwachstums deutlich zurück. In einer Phase des Myzelabbaus in der sechsten Woche werden die Filtrate wieder toxischer.

Komplizierter verlaufen die Kurven des Stammes 257. In den Erlenmeyerkolben wächst das Myzel ziemlich langsam und gleichmäßig bis zum Höchstwert nach vier Wochen, um dann leicht zurückzugehen und am Versuchsende praktisch konstant zu bleiben. Der stärkste Zuwachs erfolgt in der ersten halben Woche. Die Welkekurve fällt mit einigen Schwankungen vom ersten Maximum an bis zum Nullwert nach sieben Wochen. Auch die *Ustilago*-Aktivität geht bereits zurück, während das Myzel noch leicht zunimmt. Ob hier Toxine rasch abgebaut werden oder ob ein ephemeres, aktivierendes oder desaktivierendes Stoffwechselprodukt im Spiele steht, ist vorläufig unbekannt; ebensowenig klar ist das zweite Maximum der *Ustilago*-Aktivität, die nach der vierten Woche ohne entsprechende Vorgänge in der Welkekurve rasch und über das erste Maximum hinaus ansteigt.

Das Myzel von Stamm 257 wächst in Glaxogefäßen während der ersten sechs Wochen ziemlich gleichmäßig und nimmt darauf wieder etwas ab. Das Myzelwachstum ist also hier über die längste Periode ausgedehnt. Im Gegensatz zu den Erlenmeyerkulturen steigt der Zuwachs in der dritten Woche nochmals stark an; damit ist es vielleicht zu erklären, daß die Welkewirkung, die schon nach einer Woche ihr Maximum erreicht, während drei Wochen praktisch konstant bleibt; das andauernd und ziemlich stark wachsende Myzel würde eine Zerstörung der Toxine verhindern oder kompensieren. Die *Ustilago*-Kurve weist nach sieben Wochen ein ausgeprägtes zweites Maximum auf; wenn dieses der entsprechenden Spitze in den Erlenmeyerversuchen gleich-

zuordnen ist, würde offenbar diese zweite Toxinbildungphase (die sich in den Welkekurven nicht ausdrückt) vom Myzelwachstum weitgehend unabhängig verlaufen.

Nach dieser Interpretation würden vor allem am Anfang Wachstum und Toxinbildung parallel laufen; später wird das Bild durch Abbaureaktionen verwischt. Die stofflichen Grundlagen der skizzierten Vorgänge sind noch nicht zu überblicken.

## B. Der Einfluß von Tomatin auf die Toxinbildung

Versuchsfrage: Wird die Toxigenität der verschiedenen Stämme von *Fusarium lycopersici* durch Zusatz von Tomatin zur Nährlösung verändert?

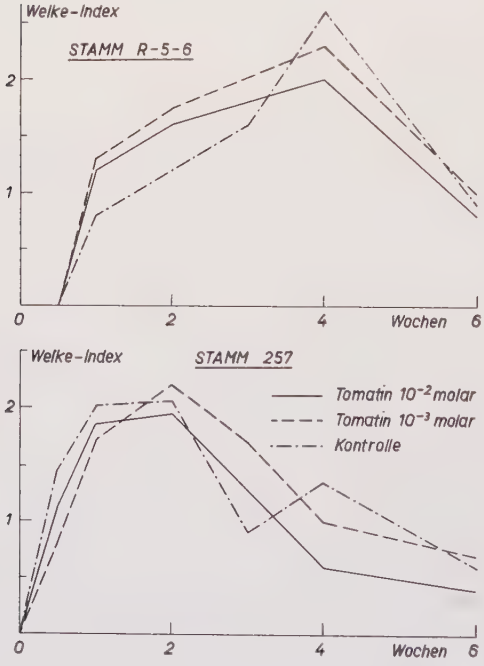



Abb. 5. Welke-Index der Kulturfiltrate (Konzentration 1/5, Dosis 0,25 ccm pro g Testpflanze) von zwei in tomatinhaltiger Nährlösung gewachsenen Stämmen des *Fusarium lycopersici*

Als Versuchsgefäße wurden hier 150-ccm-Erlenmeyerkolben mit je 25 ccm Nährlösung verwendet, um den Substanzverbrauch in tragbaren Grenzen zu halten; im übrigen wurden die Methoden des vorhergehenden Abschnitts angewandt. Für jede zu testende Lösung wurden die Filtrate von zwei bis vier Kolben vereinigt. Das pH nahm in den Kulturen mit oder ohne Tomatin wie in den früheren Versuchen (Abb. 1) dauernd zu. Die Myzelgewichte waren mit $10^{-2}$ molarem Tomatinzusatz bei beiden Stämmen besonders am Anfang deutlich höher als bei $10^{-3}$ molar, $10^{-4}$ molar und in den Kontrollen (vgl. S. 360).

Die Ergebnisse der Welkeversuche (Abb. 5) zeigen:

1. Unter den hier vorliegenden Bedingungen ist die maximale Toxizität der Filtrate beider Stämme ungefähr gleich hoch; Stamm 257 erreicht den Höchstwert nach ein bis zwei Wochen, Stamm R-5-6 nach vier Wochen. Die Toxinbildung kann also durch die Verwendung anderer Gefäße weitgehend beeinflußt werden.
2. Zwischen den Kurven mit Tomatinzusatz und den Kontrollen sind keine Unterschiede zu erkennen; es wird also offenbar die Toxinbildung bei beiden Stämmen durch Tomatin nicht beeinflußt.

### C. Die Wirkung von Preßsäften aus Tomatenpflanzen auf die Toxinbildung

Versuchsfrage: Wird die Toxigenität der verschiedenen Stämme von *Fusarium lycopersici* durch Zusatz von Preßsäften aus Tomatenpflanzen zur Nährlösung beeinflußt?

Ein Einfluß auf die Toxinbildung könnte von irgendwelchen Inhaltsstoffen der Wirtspflanzen (allein oder im Zusammenwirken mit Tomatin) ausgehen. Die Schwierigkeit besteht hier darin, möglichst unveränderte Extrakte zu erhalten; bei der Sterilisation muß mit Veränderungen und Desaktivierungen eventuell vorhandener wirksamer Substanzen gerechnet werden. Negative Resultate lassen deshalb immer noch die Möglichkeit offen, daß wir die Vorgänge lediglich methodisch noch nicht zu erfassen vermögen.

Es wurden hier Preßsäfte von Wurzeln, Stengeln und Blättern verschiedener Tomatensorten nach Sterilisation im strömenden Dampf oder durch Seitzfiltration, für sich allein oder als Zusatz zu Nährlösungen verwendet. Die Versuche sollen nicht im einzelnen geschildert werden; es kann zusammenfassend gesagt werden, daß nie ein wesentlich verändernder Einfluß der Pflanzenextrakte auf die Toxinbildung der *Fusarium*-Stämme festgestellt werden konnte.

## 5. Kapitel

## Toxinresistenz

Nach den Ergebnissen der Infektionsversuche unterscheiden sich die in dieser Arbeit verwendeten Tomatensorten in ihrer Ausbreitungsresistenz gegenüber dem *Fusarium lycopersici.* Wenn darüber hinaus ihre Resistenz gegen die Toxine des Erregers verschieden groß wäre, dürfte erwartet werden, daß sie auch im Welketest auf diese Toxine verschieden ansprechen.

Wird abgeschnittenen Sprossen der genannten sechs Tomatensorten die gleiche Menge Lycomarasmin verabreicht, so sind in Ausprägung und Stärke der Welkesymptome keine Unterschiede festzustellen (Gäumann, Naef-Roth und Miescher, 1950, S. 281—282). In eigenen Versuchen wurden mit Kulturfiltraten von *Fusarium lycopersici,* mit Eisen-Lycomarasmin und mit Fusarinsäure dieselben Ergebnisse erhalten. Alle diese Sorten sind demnach gegen die bisher bekannten Toxine des Pilzes gleich empfindlich.

In Ergänzung dieser Versuche wurde noch die Frage geprüft, ob sich Tomatin und die Toxine des *Fusarium lycopersici* gegenseitig inaktivieren. Ein für die Resistenzfrage bedeutsames Ergebnis war dabei auf Grund des bisher Gesagten nicht zu erwarten, doch schien es trotzdem gegeben, den Überblick auch nach dieser Seite hin zu vervollständigen. Aus früheren Arbeiten ist bekannt, daß Lycomarasmin durch den Wuchsstoff Strepogenin inaktiviert wird (Gäumann, Naef-Roth und Reusser, 1950), ebenso Patulin und andere Antibiotica durch SH-Verbindungen (z. B. Miescher, 1950).

Die Methoden der hier angewandten Welke- und Sporenkeimungsversuche sind auf den Seiten 356 und 367 beschrieben. Es ergab sich dabei folgendes:

1. Die Welkewirkung des Lycomarasmins wird durch Zusatz von Tomatin zur Testlösung (in gleich hoher Dosis oder in äquimolarer Menge; Tabelle 4) nicht verändert. Umgekehrt zeigt Tomatin in Gegenwart von Lycomarasmin die gleiche Wirkung auf die Sporenkeimung von *Fusarium solani* wie für sich allein. Dasselbe gilt für den Lycomarasmin-Eisen-Komplex und für Kulturfiltrate von *Fusarium lycopersici*.

*Tabelle 4*

Welkewirkung von Lycomarasmin, Tomatin und Lycomarasmin + Tomatin

| Lycomarasmin $2{,}5.10^{-3}$ molar Dosis mg/kg | Tomatin | | Welke-Index |
|---|---|---|---|
| | Konzentration molar | Dosis mg/kg | |
| 150 | 0 | 0 | 1,1 |
| 0 | $0{,}7.10^{-3}$ | 150 | 0 |
| 150 | $0{,}7.10^{-3}$ | 150 | 1,0 |
| 0 | $2{,}5.10^{-3}$ | 555 | 0 |
| 150 | $2{,}5.10^{-3}$ | 555 | 1,2 |

2. Die Aktivität der Fusarinsäure im *Ustilago*-Test wird durch Tomatinzusatz nicht verändert (Tab. 5). Auch die Welketeste der gleichen Tabelle (bei pH 5,5) zeigen keine Desaktivierung der Fusarinsäure, jedoch anscheinend eine Verschiebung in der Symptomstärke zugunsten des Stengels in Gegenwart von Tomatin; doch müssen diese Vorgänge noch näher untersucht werden.

*Tabelle 5*

Welkewirkung und *Ustilago*-Aktivität (Verdünnungseinheiten) von Fusarinsäure, Tomatin und Fusarinsäure + Tomatin

| Fusarinsäure $2{,}5.10^{-3}$ molar mg/kg | Tomatin $0{,}4.10^{-3}$ molar mg/kg | Welke-Index | | Ustilago-Einheiten |
|---|---|---|---|---|
| | | Stengel | Blätter | |
| 150 | 0 | 1,4 | 1,3 | 18 |
| 0 | 150 | 0 | 0 | 0 |
| 150 | 150 | 2,3 | 0.8 | 18 |

## 6. Kapitel

## Diskussion

Die Befunde dieser Arbeit bestätigen die Angaben der Literatur, nach denen das *Fusarium lycopersici* bei bestimmten Erreger-Wirt-Kombinationen an der Ausbreitung in der Tomatenpflanze gehindert wird. Infektionsanfälligkeit und Toxinempfindlichkeit verschiedener Tomatensorten sind gleich, ebenso die Infektionsfähigkeit verschiedener Erregerstämme; auch ihre Toxinbildung steht (soweit bekannt) mit der Pathogenität nicht in Korrelation. Doch nur in bestimmten Fällen vermag der Erreger von seinen Infektionsstellen aus zu wachsen, sich in den Gefäßen des Wirtes auszubreiten und Toxine zu bilden. Auf dieser Grundlage der gleichen Toxinempfindlichkeit, aber unterschiedlichen Ausbreitungsanfälligkeit verschieden resistenter Tomatensorten (in diesem Fall Bonny Best und Pan America) deuten Gäumann, Naef-Roth und Miescher (1950) die Pfropfversuche von Heinze und Andrus (1945).

Für die eingangs zur Diskussion gestellte Bedeutung des Tomatins als Resistenzfaktor gegen das *Fusarium lycopersici* konnten in dieser Arbeit keine Anhaltspunkte gefunden werden. Die Empfindlichkeit der verschiedenen Erregerstämme für Tomatin ist gering; eine Wachstumshemmung konnte mit verschiedenen Nährlösungen auch in hohen Konzentrationen nicht erreicht werden. Anderseits liegt das Alkaloid in Wurzel und Stengel der hier geprüften Tomatensorten nur in kleinen Mengen vor.

In den Blättern ist die Tomatinkonzentration höher; es wäre denkbar, daß sie mit der Resistenz gegen Pilze, welche die Blätter infizieren (z. B. *Cladosporium fulvum* Cooke; vgl. Raabe und Sengbusch, 1935), in Zusammenhang steht. Nachgewiesen wurde eine Giftwirkung von Tomatin und Demissin auf die Larven des Kartoffelkäfers (Kuhn und Gauhe, 1947; Kuhn, Löw und Gauhe, 1950; vgl. Tabelle 3): eine Demissinkonzentration von etwa 0,3 % oder darüber im frischen Blatt (die bei *Solanum demissum* vorhanden ist oder in Kartoffelblätter infiltriert werden kann) schützt praktisch gegen Fraß. Ähnlich wirksam ist Tomatin; dagegen ertragen die Tiere auch höhere, in Blätter infiltrierte Konzentrationen an Solanin ohne Schaden.

Es stellt sich nun die Frage nach anderen Erklärungsmöglichkeiten der Resistenzverhältnisse. Sie lassen sich auf seiten des Wirtes und auf seiten des Erregers suchen; von anatomisch-histologischen Gegebenheiten und von Abwehrreaktionen soll in diesem Zusammenhang abgesehen werden.

Auf seiten des Wirtes müßte allgemein ein Faktor gesucht werden, der das Wachstum des Erregers oder einzelner seiner Stämme wesentlich zu beeinflussen vermag. Die Existenz eines solchen Stoffes im Preßsaft oder im Xylemstrom wird in der Literatur teilweise bejaht (Gottlieb, 1943 b), teilweise verneint (Heinze und Andrus, 1945; Snyder, Baker und Hansen, 1946). Auf jeden Fall muß damit gerechnet werden, daß wir mit

unseren Methoden noch nicht in der Lage sind, einen eventuell vorhandenen, aber leicht zerstörbaren Stoff nachzuweisen. Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit dem Tomatin als einem stabilen Körper; ob die Resistenz auf einem schwer zu fassenden, labilen Faktor beruht (mit oder ohne Zusammenhang mit dem Tomatin oder seiner Bildung), werden weitere Untersuchungen zeigen müssen. Ohne Erfolg wurde hier noch versucht, durch Sporenkeimungsteste mit rohen Extrakten (mit und ohne Tomatin), durch Plattenteste mit Gewebestücken von Tomatenpflanzen (mit *Fusarium lycopersici*-Konidien beimpfte Agarplatten; IRVING, FONTAINE und DOOLITTLE, 1945) usw. Anhaltspunkte zu gewinnen. Auch HARPER (1950) gelang es nicht, in den resistenten Bananensorten einen das *Fusarium cubense* E. F. S., den Erreger der Panama-Krankheit, hemmenden Stoff nachzuweisen. Kulturversuche mit Rhizomstücken und Extrakten ergaben keine positiven Resultate; Alkoholextrakte aus Rhizomen zeigten wohl Hemmungswirkungen gegen Bakterien und auch gegen das *Fusarium cubense*, doch ließ sich die antibiotische Aktivität nicht mit den Resistenzverhältnissen korrelieren.

Auf seiten des Erregers liegen noch Möglichkeiten in der Toxinbildung (im weitesten Sinne). Die natürlichen Infektionen von Tomatenpflanzen durch *Fusarium lycopersici* verursachen in den Fällen mit deutlicher Erkrankung regelmäßig starke braune Verfärbungen der Stengelgefäße, welche durch Lycomarasmin und durch Fusarinsäure nicht ausgelöst werden und in unseren bisher geprüften Kulturfiltraten nur ausnahmsweise auftraten. Es wäre möglich, daß diese Bräunung der Gefäße durch ein drittes Toxin von *Fusarium lycopersici* hervorgerufen wird; ob dieses nach WHITE (1927) Enzymcharakter hat und ob es mit dem Resistenzproblem im Zusammenhang steht (indem es z. B. durch seine enzymatischen Fähigkeiten dem Erreger das Wachstum in der Pflanze ermöglicht), bleibt noch zu untersuchen.

## Zusammenfassung

1. Es wird die Frage geprüft, ob das in Tomatenpflanzen enthaltene Alkaloid-Glykosid Tomatin einen Resistenzfaktor gegen *Fusarium lycopersici* darstellt.
2. Das *Fusarium lycopersici* infiziert die Wurzeln der Tomatenpflanzen. Alle geprüften Tomatensorten sind für alle geprüften Pilzstämme infektionsanfällig; eine Generalisation ist jedoch nur dem stark pathogenen Stamm R-5-6 in anfälligen Sorten (Bonny Best, Marglobe, Rutgers, Tuckswood) möglich.
3. Die Wirkung des Tomatins auf die Sporenkeimung und das Myzelwachstum von *Fusarium lycopersici* ist gering; auch in hohen Konzentrationen konnte nur in bestimmten Fällen eine Hemmung festgestellt werden. Andere Pilze sind zum Teil empfindlicher.
4. In Wurzeln und Stengeln verschiedener Tomatensorten wurde ein Tomatingehalt von 0,04 bis 0,2 % des Trockengewichtes, in Blättern ein solcher von 0,2 bis 2 % gefunden. Die aus der Stengelbasis abgezapften

Blutungssäfte enthielten Tomatin in Konzentrationen von rund $10^{-4}$ molar. Es kann vermutet werden, daß Tomatin wenigstens teilweise in der Wurzel gebildet und in den Blättern angereichert wird.

5. Auf Grund dieser Ergebnisse muß angenommen werden, daß Tomatin für die Krankheitsresistenz gegen *Fusarium lycopersici* keine Rolle spielt.
6. Die Toxinbildung durch das *Fusarium lycopersici* in vitro zeigt keine Beziehung zur Pathogenität der betreffenden Stämme in vivo.
7. Die stärkste Toxinproduktion erfolgt weitgehend in den ersten zwei Kulturwochen durch das junge, intensiv wachsende Myzel.
8. Tomatin und Preßsäfte aus Tomatenpflanzen beeinflussen die Toxinbildung von *Fusarium lycopersici* in vitro nicht.
9. Alle geprüften Tomatensorten sind gegen die Toxine von *Fusarium lycopersici* gleich empfindlich. Tomatin und die Toxine von *Fusarium lycopersici* inaktivieren sich gegenseitig nicht.

Die vorliegende Arbeit entstand im Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. E. Gäumann. Meinem verehrten Lehrer möchte ich an dieser Stelle für seine großzügige Unterstützung herzlich danken. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern unseres Institutes, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, insbesondere Frau G. Scholl und Frau Dr. N. Winterhalter.

## Literaturverzeichnis

Alexander, L. J. und Tucker, C. M., 1945. Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum f. lycopersici.* (J. agr. Res. **70**, 303—313)

Biedermann, W. und Müller, E., 1951. Die Inaktivierung des gelösten Kupfers (II) in Fungiziden. (Phytopath. Z. **18**, 307—338)

Blank, F., 1945. Alkaloidbildung in der Pflanzenwurzel. (Experientia **1**, 111—115)

Blumer, S. und Gondek, J., 1946. Über die Wirkung des Oxychinolins auf *Botrytis cinerea* Pers. (Ber. Schw. Bot. Ges. **56**, 467—499)

— — und Kundert, J., 1950. Methoden der biologischen Laborprüfung von Kupferpräparaten. (Phytopath. Z. **17**, 161—199)

Boit, H.-G., 1950. Fortschritte der Alkaloidchemie seit 1933. Berlin, 425 S.

Boller, A., 1951. Über Lycomarasmin, ein welkaktives Stoffwechselprodukt aus *Fusarium lycopersici* Sacc. Diss. E. T. H. Zürich, 122 S. s. a. Plattner, Pl. A. c. s., 1948 (Helv. Chim. Acta **31**, 594—602; 860—869)

Brian, P. W., 1949. Studies on the Biological Activity of Griseofulvin. (Ann. Bot. N. S. **13**, 59—77)

— —, Curtis, P. J. und Hemming, H. G., 1946. A substance causing abnormal development of fungal hyphae produced by *Penicillium Janczewskii* Zal. (Trans. Brit. Myc. Soc. **29**, 173—187)

— —, — — und — —, 1947. Glutinosin: a fungistatic metabolic product of *Metarrhizium glutinosum* S. Pope. (Proc. Roy. Soc. [B] **135**, 106—132)

— —, — — und — —, 1948. Gladiolic acid, an Antibiotic substance produced by *Penicillium gladioli* McCull et Thom. (J. gen. Microbiol. **2**, 341—355)

— —, — —, — — und McGowan, J. C., 1946. Production of Viridin by pigment-forming strains of *Trichoderma viride.* (Ann. Appl. Biol. **33**, 190—200)

BRIAN, P. W., CURTIS, P. J., HEMMING, H. G., JEFFERYS, E. G., UNWIN, C. H. und WRIGHT, J. M., 1951. Alternaric Acid ;a Biologically Active Metabolic Product of *Alternaria solani* (Ell. et Mart.) Jones et Grout; its Production, Isolation and Antifungal Properties. (J. gen. Microbiol. **5**, 619—632; s. a. Nature **164**, 534)

— — und HEMMING, H. G., 1945. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. (Ann. Appl. Biol. **32**, 214—220)

BRINK, N. G. und FOLKERS, K., 1951. Isolation of Tomatidine from the Roots of the Rutgers Tomato Plant. (J. Amer. Chem. Soc. **73**, 4018)

DAWSON, R. F., 1948. Alkaloid Biogenesis. (Adv. Enzymology **8**, 203—251)

ENDERS, C. und WIENINGER, F. M., 1937. Die Beeinflussung des Vergärungs- und Vermehrungsvermögens der Hefe durch Alkaloide. (Biochem. Z. **293**, 22—29)

FONTAINE, T. D., ARD, J. S. und MA, R. M., 1951. Tomatidine, a Steroid secondary Amine. (J. Am. Chem. Soc. **73**, 878—879)

— —, IRVING, G. W. Jr., MA, R., POOLE, J. B. und DOOLITTLE, S. P., 1948. Isolation and Partial Characterization of Crystalline Tomatine, an Antibiotic Agent from the Tomato Plant. (Arch. Biochem. **18**, 467—475)

FREY-WYSSLING, A., 1938. Über die Herkunft der sekundären Pflanzenstoffe. (Naturwiss. **26**, 624—628)

— —, 1949. Ernährung und Stoffwechsel der Pflanzen. 2. Aufl. Zürich, 288 S.

GÄUMANN, E., 1951 a. Pflanzliche Infektionslehre. 2. Aufl. Basel, 681 S.

— —, 1951 b. Some Problems of Pathological Wilting in Plants. (Adv. Enzymology **11**, 401—437)

— —, 1951 c. Neuere Erfahrungen mit Welketoxinen. (Experientia **7**, 441—447)

— —, 1951 d. Über den Einfluß der Temperatur auf den Welke-Effekt beim toxigenen Welken. (Phytopath. Z. **17**, Heft 4, 1—4)

— — und BÖHNI, E., 1947. Über adaptive Enzyme bei parasitischen Pilzen I und II. (Helv. Chim. Acta **30**, 24—38, 1591—1595)

— — und JAAG, O., 1946. Über das Problem der Welkekrankheiten bei Pflanzen. (Experientia **2**, 215—220)

— — und NAEF-ROTH, St., 1950. L'influence de la température sur le degré de toxicité des toxines phytopathogènes. (C. R. Ac. Sc. **230**, 258—260)

— —, — —, und ETTLINGER, L., 1950. Zur Gewinnung von Enniatinen aus dem Myzel verschiedener Fusarien. (Phytopath. Z. **16**, 289—299)

— —, — — und KOBEL, H., 1952 a. L'acide fusarique, une seconde toxine de flétrissement produite par *Fusarium lycopersici* Sacc. (C. R. Ac. Sc. **234**, 173—174)

— —, — — und — —, 1952 b. Les synergismes chez les toxines de *Fusarium lycopersici* Sacc. (C. R. Ac. Sc. **234**, 276—278)

— —, — — und MIESCHER, G., 1950. Untersuchungen über das Lycomarasmin. (Phytopath. Z. **16**, 257—288)

— —, — — und REUSSER, P., 1950. Über die Inaktivierung von Lycomarasmin durch Strepogenin. (Phytopath. Z. **17**, 229—232)

— —, — —, — — und AMMANN, A., 1952. Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. (Phytopath. Z. **19**, 160—220.

GERDEMANN, J. W. und FINLEY, A. M., 1951. The Pathogenicity of Races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum f. lycopersici.* (Phytopath. **41**, 238—244)

GILLIVER, K., 1946. The Inhibitory Action of Antibiotics on Plant Pathogenic Bacteria and Fungi. (Ann. Bot. N. S. **10**, 271—282)

GOTTLIEB, D., 1943 a. The Presence of a Toxin in Tomato Wilt. (Phytopath. **33**, 126—135)

— —, 1943 b. Expressed Sap of Tomato Plants in Relation to Wilt Resistance. (Phytopath. **33**, 1111)

Gottlieb, D., 1944. The Mechanism of Wilting caused by *Fusarium bulbigenum* var. *lycopersici*. (Phytopath. **34**, 41—59)

Greathouse, G. A., 1938. Suggested Rôle of Alkaloids in Plants Resistant to *Phymatotrichum omnivorum*. (Phytopath. **28**, 592—593)

— — und Rigler, N. E., 1940. The Chemistry of Resistance of Plants to *Phymatotrichum* Root Rot. V. Influence of Alkaloids on Growth of Fungi. (Phytopath. **30**, 475—485)

Harper, J. L., 1950. Studies in the Resistance of certain Varieties of Banana to Panama Disease. (Plant and Soil **2**, 374—382)

Haymaker, H. H., 1928. Relation of Toxic Excretory Products from two Strains of *Fusarium lycopersici* to Tomato Wilt. (J. Agr. Res. **36**, 697—719; s. a. 675—695)

Heinze, P. H. und Andrus, C. F., 1945. Apparent Localization of *Fusarium* Wilt Resistance in the Pan America Tomato. (Amer. J. Bot. **32**, 62—66)

Henry, T. A., 1939. The Plant Alkaloids. 3. Aufl. London, 689 S.

Irving, G. W. Jr., 1947. The Significance of Tomatin in Plant and Animal Diseases. (J. Wash. Acad. Sci. **37**, 293—296)

— —, Fontaine, Th. D. und Doolittle, S. P., 1945. Lycopersicin a Fungistatic Agent from the Tomato Plant. (Science **102**, 9)

Kobel, F., 1951. Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. (Phytopath. Z. **18**, 157—195)

Kuhn, R. und Gauhe, A., 1947. Über die Bedeutung des Demissins für die Resistenz von *Solanum demissum* gegen die Larven des Kartoffelkäfers. (Z. Naturf. **2** *b*, 407 bis 409)

— — und Löw, I., 1947. Über Demissin, ein Alkaloidglykosid aus den Blättern von *Solanum demissum*. (Chem. Ber. **80**, 406—410)

— — und — —, 1948. Notiz über ein Alkaloidglykosid aus den Blättern einer Wildtomate. (Chem. Ber. **81**, 552—553)

— —, — — und Gauhe, A., 1950. Über das Alkaloidglykosid von *Lycopersicum esculentum* var. *pruniforme* und seine Wirkung auf die Larven des Kartoffelkäfers. (Chem. Ber. **83**, 448—452)

Luz, G., 1934. Über den Stoffwechsel von *Fusarium lycopersici* und *Fusarium lini*. (Phytopath. Z. **7**, 585—638)

Ma, R. und Fontaine, T. D., 1948. In Vitro Antibiotic Activity of Crystalline Tomatine toward *Candida albicans*. Antagonistic Effect of Rutin and Quercetin. (Arch Biochem. **16**, 399—402)

Miescher, G., 1950. Über die Wirkungsweise von Patulin auf höhere Pflanzen, insbesondere auf *Solanum lycopersicum* L. (Phytopath. Z. **16**, 369—397)

Mothes, K., 1928. Pflanzenphysiologische Untersuchungen über die Alkaloide. I. Das Nikotin im Stoffwechsel der Tabakpflanze. (Planta **5**, 563—615)

— —, 1950. Das Alkaloidproblem. (Südd. Apotheker-Zeitung 1950, 387—391)

— — und Hieke, K., 1943. Die Tabakwurzel als Bildungsstätte des Nikotins. (Naturwiss. **31**, 17—18)

— — und Romeike, A., 1951. Über die Anhäufung von Alkaloiden in Organen der Speicherung und Reproduktion. (Biol. Zentralbl. **70**, 97—113)

Paech, K., 1949. Stoffwechsel organischer Verbindungen II. (Fortschr. Bot. **12**, 287—322; s. a. **13**, 269—296, 1951)

— —, 1950. Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe. Berlin—Göttingen—Heidelberg, 268 S.

Raabe, A. und Sengbusch, R. v., 1935. Zur Physiologie von *Cladosporium fulvum*. (Gartenbauwiss. **9**, 183—188)

Sato, Y., Katz, A. und Mosettig, E., 1951. Degradation of Tomatidine. (J. Am. Chem. Soc. **73**, 880)

Schmid, H., 1948. Über die Nikotinbildung in der Tabakpflanze. (Ber. Schw. Bot. Ges. **58**, 5—44)

Schmidt, M., 1933. Zur Entwicklungsphysiologie von *Cladosporium fulvum* und über die Widerstandsfähigkeit von *Solanum racemigerum* gegen diesen Parasiten. (Planta **20**, 407—439)

Seka, R., 1933. Alkaloide, in Kleins Handb. d. Pflanzenanalyse, Band IV, 476—761.

Snyder, W. C., Baker, K. F. und Hansen, H. N., 1946. Interpretation of Resistance to *Fusarium* Wilt in Tomato. (Science **103**, 707—708)

Szpilfogel, St. A., 1948. Zur Kenntnis des Solanidins. Diss. E. T. H. Zürich, 61 S.; s. a. Prelog, V. und Szpilfogel, St. A., 1942 (Helv. Chim. Acta **25**, 1306—1313); 1944 (l. c. **27**, 390—400)

Turel, F., 1952. Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. (Phytopath. Z. **19**, 307—342.

Wellman, F. L., 1939. A Technique for Studying Host Resistance and Pathogenicity in Tomato *Fusarium* Wilt. (Phytopath. **29**, 945—956)

— —, 1943. Comparative toxic Effects of Extracts from mild and virulent Isolates of Tomato-Wilt *Fusarium*. (Phytopath. **33**, 1004—1017)

Whiffen, A. J., 1950. The Activity in vitro of Cyclo-Heximide (Acti-dione) against Fungi Pathogenic to Plants. (Mycologia **42**, 253—258)

White, R. P., 1927. Studies on Tomato Wilt caused by *Fusarium lycopersici* Sacc. (J. Agr. Res. **34**, 197—239)

Wolf, M. J. und Duggar, B. M., 1946. Estimation and Physiological Role of Solanine in the Potato. (J. Agr. Res. **73**, 1—32)

*Institut für Getreide-, Ölfrucht- und Futterpflanzenbau der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Kiel-Kitzeberg*
*Direktor: Oberregierungsrat Dr. Speyer*

# Der Einfluß der Stickstoffdüngung auf die Halmbruchkrankheit (Lagerfußkrankheit) des Weizens

Von
H. Bockmann

Das Auftreten von Lagerschäden an Getreidepflanzen, insbesondere an Winterweizen, ist nicht immer darauf zurückzuführen, daß die Masse des Blattwerkes in einem Mißverhältnis zur Festigkeit des Halmes steht, sondern sehr oft auch darauf, daß die unteren Halmglieder von einem Pilz befallen werden, der eine Vermorschung des Gewebes herbeiführt und die Pflanzen vorzeitig zum Umfallen bringt. Im Gegensatz zum „Üppigkeitslagern" (Mastlagern), welches meistens erst durch Unwetter ausgelöst wird, tritt das „krankhafte Lagern" nicht selten bei schönstem Wetter ein, wenngleich Regen und Wind auch hier das Hinlegen beschleunigen. Diese unter dem Namen „Halmbruchkrankheit" oder „Lagerfußkrankheit" bekannte Erscheinung ist vor allem daran zu erkennen, daß die Halme flach auf dem Boden liegen und beim Herausziehen eben über der Erdoberfläche abreißen. Das Zerstörungswerk des die Krankheit verursachenden Pilzes ist an dieser Stelle deutlich zu erkennen. Beim „Üppigkeitslagern" hingegen liegen die Pflanzen „hohl". Sie sind am Fuß, wenigstens anfangs noch, völlig gesund; erst später werden sie ebenfalls braun, so daß eine Unterscheidung vom krankhaften Lagern nicht immer möglich ist.

Es ist bekannt, daß Lagerschäden an Getreide sehr oft auf zu reichlich bemessene Stickstoffdüngung zurückzuführen sind (1923, S. 36). Ob dadurch aber auch die Halmbruchkrankheit gefördert wird, bedarf noch der Klärung. Bisher hat man dem Landwirt empfohlen, auf Feldern, wo Gefahr durch Fußkrankheit vorliegt (zu häufige Wiederkehr von Wintergetreide, insbesondere Weizen) mit den Stickstoffgaben vorsichtig zu sein (1949, S. 629/630). Ob und inwieweit das nötig ist, soll im folgenden an Hand mehrerer einschlägiger Versuche besprochen werden.

Die Untersuchungen wurden in den Jahren 1949/50 und 1950/51 an Weizen auf dem Versuchsfeld und auf verschiedenen Feldern in der Praxis durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, daß die Bestände in gesunder Fruchtfolge standen; die Halmbruchkrankheit wurde jeweils durch Infektion mit dem Erreger, dem Pilz *Cercosporella herpotrichoides* Fron, künstlich hervorgerufen (1950, S. 297/298).

Von der Möglichkeit, die Versuche auf natürlich verseuchten Böden anzulegen, wurde absichtlich abgesehen, da unter diesen Verhältnissen keine gesunden Kontrollparzellen vorhanden gewesen wären. Man hätte wohl die Wirkung der N-Düngung auf die Krankheit bekommen; der praktisch wichtige Vergleich zur Wirkung der N-Düngung auf gesunden Weizen wäre aber nicht möglich gewesen. In den Versuchen mit künstlicher Infektion auf unverseuchten Feldern waren dagegen folgende Parzellen unmittelbar miteinander vergleichbar:

1. Uninfiziert — Ohne Stickstoffzudüngung
2. Infiziert — Ohne Stickstoffzudüngung
3. Uninfiziert — Mit Stickstoffzudüngung
4. Infiziert — Mit Stickstoffzudüngung.

In allen Versuchen wurde ortsübliche Grunddüngung gegeben, nämlich 2—3 dz/ha Kali, 3—4 dz/ha Thomasmehl, 0,5—1 dz/ha Kalkstickstoff im Herbst und 1—1,5 dz/ha Kalkammonsalpeter als Kopfdüngung im Frühjahr. Auf den Parzellen mit Stickstoff-Zudüngung wurden zusätzlich 2 dz/ha Kalkammonsalpeter im März/April verabfolgt, so daß hier eine beachtliche Überdüngung mit Stickstoff stattfand.

Die Auswertung der Versuche erstreckte sich auf die Feststellung der Ertragsunterschiede zwischen den uninfizierten und infizierten Parzellen, jeweils mit und ohne Stickstoffdüngung, weiter auf die Unterschiede in der Lagerung, dem Befall, der Bestandsdichte, der Bestockung und der Ährenzahl. Die 4 letzten Bonitierungen wurden allerdings erst in den Versuchen des Jahres 1950/51 eingehender vorgenommen.

In den Zusammenstellungen ist auf die Wiedergabe absoluter Ertragszahlen verzichtet worden. Es sind nur die Ertragsverluste gegenüber den uninfizierten Kontrollen (= 100) aufgeführt, und zwar für a) Ohne Stickstoffzudüngung; b) Mit Stickstoffzudüngung.

**Zusammenstellung I**

Ertragsverluste durch Infektion mit *Cercosporella herpotrichoides* an Winterweizen mit und ohne Stickstoffzudüngung im Frühjahr

(Ertrag der uninfizierten Parzellen jeweils = 100 gesetzt)

| Jahr | Versuch | A. Ohne N-Zudüngung Abweichung | | B. Mit N-Zudüngung Abweichung | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Kornertrag | Strohertrag | Kornertrag | Strohertrag |
| 1949/50 | 1. G. Reese, Reesdorf ..... | — 40,6 | + 3,8 | — 20,2 | — 14,3 |
| | 2. M. Horst, Reesdorf ..... | — 26,3 | + 1,5 | + 2,3 | + 10,9 |
| 1950/51 | 3. E. Reese, Reesdorf ..... | — 45,9 | — 42,7 | — 20,8 | — 14,2 |
| | 4. H. Blöcker, Reesdorf .... | — 14,3 | — 16,5 | — 12,5 | — 6,7 |
| | 5. W. Schramm, Kl.-Barkau . | — 20,9 | — 28,0 | — 9,4 | — 2,4 |
| | 6. M. Horst, Reesdorf ..... | + 1,8 | + 7,7 | — 3,9 | + 10,9 |
| | 7. Vers.-Feld, Kitzeberg .... | — 30,0 | — 23,9 | — 17,8 | — 9,9 |
| | Durchschnitt: | — 25,2 | — 14,0 | — 11,8 | — 3,7 |

Aus dem errechneten Durchschnittswert ergibt sich ein deutlicher Verlust durch die Infektion, aber gleichzeitig auch eine Verminderung dieses Verlustes durch die zusätzliche Stickstoffdüngung. Auffällig ist, daß in erster Linie der Strohverlust zurückgeht (von 14,0 ohne N- auf 3,7 % mit N-Zudüngung), während der Verlust an Korn (von 25,2 % auf 11,8 %) weniger davon berührt wird.

Beim Vergleich der durch die Infektion verursachten Schäden in den einzelnen Versuchen fällt es auf, daß 6 von 7 Versuchen in der Richtung des errechneten Mittelwertes liegen. Nur 1 Versuch (6) fällt, wenigstens in bezug auf den Verlust an Korn, etwas aus dem Rahmen heraus. Um hierfür eine Erklärung zu finden, haben wir in der Zusammenstellung II die Versuche nach der Bestandsdichte im Frühjahr geordnet und mit der Verlustminderung verglichen, die mit Hilfe der N-Zudüngung in den einzelnen Fällen erreicht worden war.

**Zusammenstellung II**

| Versuch Nr. | Zahl der Pflanzen in der Drillreihe über 1 m Länge | Verlustminderung durch N-Zudüngung bezogen auf Kornertrag | Verlustminderung durch N-Zudüngung bezogen auf Strohertrag |
|---|---|---|---|
| 6 | 62,2 | — 5,7 | — 3,2 |
| 4 | 47,3 | + 1,8 | + 9,8 |
| 1 | 40,5 | + 20,4 | — 17,1 |
| 3 | 39,5 | + 25,1 | + 28,5 |
| 5 | 36,9 | + 11,5 | + 25,6 |
| 7 | 29,6 | + 12,2 | + 14,0 |
| 2 | 29,0 | + 28,6 | — 9,4 |

Für die Verlustminderung, bezogen auf Korn, geht aus dieser Zusammenstellung hervor, daß der Versuch 6, der aus dem Rahmen der übrigen Versuche herausfällt, den dichtesten Pflanzenbestand aufwies. Der Versuch 4, bei dem die geringste Verlustminderung eingetreten war, steht in bezug auf die Bestandsdichte an zweiter Stelle. Umgekehrt war im Versuch 2 mit der geringsten Bestandsdichte die N-Wirkung am besten. Die übrigen Versuche liegen dazwischen, ohne allerdings eine besondere Regelmäßigkeit zu zeigen. Für die Verlustminderung an Stroh läßt sich keine besondere Regelmäßigkeit nachweisen.

Wir müssen hinsichtlich des Kornertrages, auf den es ja in erster Linie ankommt, aus diesen Ergebnissen die Folgerung ziehen, daß eine zusätzliche Stickstoffdüngung zur Verminderung des Schadens durch die Halmbruchkrankheit nur dann mit Erfolg angewendet werden kann, wenn der Bestand entsprechend dünn ist. Eine Stickstoffdüngung im dichteren Bestande wirkt sich nicht mehr günstig aus (4); es besteht sogar die Gefahr, daß der Schaden erhöht wird (6).

Um festzustellen, ob und inwieweit sich die zusätzliche Stickstoffgabe auf den eigentlichen Befall durch die Halmbruchkrankheit auswirkt, wurden in den Versuchen des Jahres 1951 eingehende Befallsauszählungen vorgenommen. Die einzelnen Pflanzen wurden nach dem Mähen (also an den Stoppeln) nach schwer befallen (+++), schwach befallen (+) und unbefallen (—) unterschieden. Vorher wurde die Stärke der Lagerung bonitiert, wobei „stärkste Lagerung" mit 5 und „nicht lagernd" mit 0 bezeichnet wurde. Schließlich wurden auch Feststellungen hinsichtlich der Bestockung getroffen, indem die Anzahl der voll entwickelten Triebe je Pflanze ausgezählt wurde.

In der Zusammenstellung III sind die Befallszahlen in % der ausgezählten Pflanzen, getrennt nach Infektion und Stickstoffzudüngung aufgeführt. Der Wert für die Stärke der Lagerung ist als Durchschnittswert aus den gleichartigen Parzellen errechnet. Die Bestockung endlich ist in der Anzahl der voll entwickelten Triebe je Pflanze ausgedrückt, die sich als Durchschnittswert aus zahlreichen Auszählungen ergibt.

Aus Gründen, die weiter unten ersichtlich sind, wurden die Werte aus den Versuchen 3—6 getrennt von denjenigen aus 7 wiedergegeben.

**Zusammenstellung III**

| Versuch | Uninfiziert Ohne N-Zudg. | Infiziert Ohne N-Zudg. | Uninfiziert Mit N-Zudg. | Infiziert Mit N-Zudg. |
|---|---|---|---|---|
| 3—6 | Befall in %<br>+++ ++ —<br>9,0 28,0 63,0<br>Stärke der Lagerung 2,5<br>Bestockung 1,8 | Befall in %<br>+++ ++ —<br>85,0 15,0 0,0<br>Stärke der Lagerung 3,8<br>Bestockung 1,4 | Befall in %<br>+++ + —<br>8,0 31,0 61,0<br>Stärke der Lagerung 3,1<br>Bestockung 2,0 | Befall in %<br>+++ + —<br>57,0 42,0 1,0<br>Stärke der Lagerung 3,6<br>Bestockung 1,9 |
| 7 | Befall in %<br>+++ + —<br>0,5 12,9 86,9<br>Stärke der Lagerung 0,8<br>Bestockung 2,93 | Befall in %<br>+++ + —<br>37,6 47,8 14,6<br>Stärke der Lagerung 2,7<br>Bestockung 2,63 | Befall in %<br>+++ + —<br>0,1 12,8 87,1<br>Stärke der Lagerung 1,0<br>Bestockung 3,43 | Befall in %<br>+++ + —<br>34,2 48,2 17,5<br>Stärke der Lagerung 2,8<br>Bestockung 3,40 |

Aus dieser Zusammenstellung ergibt sich, daß der Befall mit Halmbruchkrankheit durch eine zusätzliche Stickstoffdüngung deutlich vermindert wird. Am besten kommt das in den Werten für die Versuche 3—6 zum Ausdruck. Hier ist die Anzahl der „schwer befallenen" Pflanzen bei „Infiziert mit N-Zudüngung" deutlich geringer als bei „Infiziert ohne N-Zudüngung", während die Anzahl der

„schwach befallenen" Pflanzen größer ist. In Versuch 7 ist dasselbe festzustellen, jedoch sind die Unterschiede nicht so deutlich.

Bemerkenswert ist, daß im Versuch 7 der Befall im ganzen geringer ist als im Durchschnitt der Versuche 3—6. In Übereinstimmung damit steht, daß auch die Lagerung nicht so stark ist.

Für die Stärke der Lagerung innerhalb der einzelnen Versuche besagen die Ergebnisse nur, daß die Infektion eindeutig zu einer verstärkten Lagerung geführt hat. Für die Beurteilung der Stickstoffwirkung sind die Unterschiede zu gering. Während in den uninfizierten Parzellen noch eine geringe Zunahme der Lagerung festgestellt werden kann, sind die Zahlen für die Stärke dieser Erscheinung auf den infizierten Parzellen annähernd gleich. Immerhin bedeutet das, daß die Stickstoffdüngung auf den infizierten Parzellen sich nicht lagerverstärkend ausgewirkt hat.

Bemerkenswerte Unterschiede in den einzelnen Versuchen ergaben sich für die Bestockung, wobei unter den diesbezüglichen Werten die Anzahl der voll entwickelten Triebe je Pflanze zu verstehen ist. Bei Vergleich der Versuche 3—6 mit Versuch 7 müssen wir hinsichtlich der Lagerung feststellen, daß diese im 1. Falle stärker ist als im zweiten. Bei der Bestockung liegen die Verhältnisse gerade umgekehrt. Während in den Versuchen 3—6 im Höchstfalle 2 Triebe je Pflanze zur vollen Entwicklung gelangten, sind es im Versuch 7 mehr als 3 je Pflanze. Für die Wirkung der N-Zudüngung auf die Bestockung kann festgestellt werden, daß diese sowohl auf den uninfizierten als auch auf den infizierten bestockungsfördernd gewesen ist. Die Wirkung auf den infizierten Parzellen ist dabei besser als auf den uninfizierten. Die Infektion endlich hat die Bestockung gehemmt. Diese ist auf den Parzellen ohne N-Zudüngung schlechter als auf den zugehörigen uninfizierten Kontrollen. Nach der Stickstoffzugabe ist sie dagegen annähernd gleich bzw. sogar besser als auf den uninfizierten Parzellen mit N-Zudüngung.

Die letzten, in den Versuchen vorgenommenen Auszählungen bezogen sich auf die Ährenzahl. Sie sind in Zusammenstellung IV enthalten. Es handelt sich um Durchschnittswerte für 1 m in der Drillreihe.

**Zusammenstellung IV**

Durchschnittliche Ährenzahl auf 1 m in der Drillreihe

| Versuch Nr. | Uninfiziert Ohne N-Zudg. | Infiziert Ohne N-Zudg. | Uninfiziert Mit N-Zudg. | Infiziert Mit N-Zudg. |
|---|---|---|---|---|
| 3 | 37,5 | 29,9 | 42,8 | 41,5 |
| 4 | 50,5 | 43,8 | 44,1 | 45,8 |
| 5 | 56,6 | 44,9 | 68,3 | 64,6 |
| 6 | 47,9 | 52,8 | 55,8 | 57,0 |
| Durchschnitt | 48,1 | 42,9 | 52,8 | 52,2 |

Für die Wirkung der Stickstoffdüngung ist auch hier festzustellen, daß (mit einer Ausnahme) die Ährenzahl durch die N-Zugabe erhöht worden ist;

das gilt sowohl für die infizierten als auch für die uninfizierten Parzellen. Am geringsten ist die Wirkung in den Versuchen 4 und 6, die den dichtesten Pflanzenbestand aufwiesen (vgl. Zusammenhang mit den Kornverlusten, S. 3 und 4), besser ist sie in 3 und 5, den Versuchen mit dem dünneren Pflanzenbestand.

Eine merkliche Verminderung hat die Ährenzahl durch die Infektion erfahren, wenn kein Stickstoff zusätzlich verabfolgt wurde. Mit der Zugabe von Stickstoff wurde annähernd die gleiche Ährenzahl erreicht wie auf den uninfizierten Parzellen mit N-Zudüngung.

Die aus den Freilandversuchen der Jahre 1949—1951 gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß für den Einfluß der Stickstoffdüngung auf die Halmbruchkrankheit des Weizens die Bestandsdichte und Bestockung offensichtlich eine besondere Bedeutung haben. Wenn der Bestand hinreichend dünn ist, so daß die Pflanzen sich gut bestocken und auch mehrere Ähren zur vollen Entwicklung bringen können, dann wirkt sich eine zusätzliche Stickstoffdüngung befalls- und verlustmindernd aus, weil sie die Bestockung fördert und gleichzeitig die Versorgung der Bestockungstriebe bis zum Abschluß ihres Wachstums sichert. Wenn aber der Pflanzenbestand dichter ist, so daß die Einzelpflanzen um ihren Standraum kämpfen und sich dabei gegenseitig in die Höhe treiben, dann wirkt sich eine zusätzliche N-Gabe nicht mehr befallshemmend, sondern eher befallsfördernd aus.

## Literaturverzeichnis

Bockmann, H., 1950, Über die Halmbruchkrankheit des Weizens und ihren Erreger *Cercosporella herpotrichoides* Fron. Phytopathologische Zeitschrift **17**, 3, S. 293—304.

Callsen, H., 1949, Fußkrankheiten im Winterweizen. Schl. Holst. Landpost **89**, 36, S. 629—630.

Schindler, 1923, Handbuch des Getreidebaues. Berlin.

*Aus dem Institut für Obstbau*
*der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Heidelberg*
*Direktor: Oberregierungsrat Dr. H. Thiem*

# Die Cylindrosporium-Krankheit an Süß- und Sauerkirschen in Europa und Nordamerika

Von

H. Hochapfel

*Mit 6 Abbildungen*

## I. Befallsgebiete, systematische Frage und Bezeichnung der Krankheit

Ende Mai 1951 wurde dem Institut für Obstbau der Biologischen Bundesanstalt in Heidelberg von einer Baumschule bei Burgsinn in Oberfranken über eine anscheinend ernst zu nehmende neuartige Schädigung bei Kirsch-

Abb. 1. Verschieden stark durch *Cylindrosporium Padi* erkrankte Blätter von Süßkirsche. Blattunterseite mit Konidienlagern und angetrockneten weißlichen Sporenmassen. Rechtes Blatt vergilbt *Burgsinn, Oberfranken, 20. 7. 1951*

sämlingen berichtet, deren Ursache dort bisher von keiner Stelle ermittelt worden war. Danach hatte die Erkrankung im Jahre 1950 damit begonnen, daß die Blätter vorzeitig vergilbten und bereits im August abfielen, wobei sie auf der Unterseite einen weißlichen, schimmelartigen Belag zeigten. Der

Hauptschaden hatte sich jedoch erst im Frühjahr 1951 bemerkbar gemacht. Eine beträchtliche Zahl der blattkrank gewesenen Sämlinge trieb überhaupt nicht oder nur im unteren Teile aus, da sie während des Winters von der Spitze her mehr oder weniger weit abgestorben waren. Der Besitzer hatte diese Pflanzen aus dem Bestand entfernt und einige zur Untersuchung eingesandt. Die entblätterten Sämlinge waren tatsächlich nur in ihren oberirdischen Teilen abgestorben, nicht im Wurzelstock. Aus dem toten Stengelgewebe konnte indessen kein Schädling isoliert werden, und erst an den daraufhin angeforderten Blättern war die Ursache für das ungewohnte Krankheitsbild festzustellen. Es handelte sich um eine ähnliche Blattfleckenkrankheit, wie sie in Nordamerika an Kirschen schon seit etwa 1885 bekannt ist. Auch hier entsteht der größte Schaden durch den verfrühten Blattfall. Der pilzliche Erreger ist dort die *Discomycetenart Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. mit der Konidienform *Cylindrosporium hiemalis*.

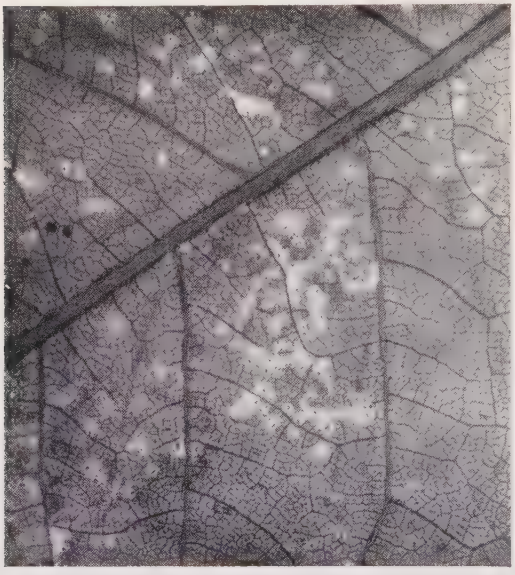


Abb. 2. Kirschblattunterseite vergrößert mit Sporenlagern (Acervuli) und angetrockneten weißlichen Sporenmassen

Die Ende Juni 1951 übersandten Blätter zeigten die für den genannten Pilz typischen kleinen runden, violettroten Flekken und ebenso bei starkem Befall das Vergilben des Blattgewebes zwischen diesen Befallsstellen (Abb. 1). Außerdem fanden sich vor allem an der Blattunterseite die unmittelbar unter der Epidermis liegenden *Cylindrosporum*-Konidienlager bzw. Acervuli mit den ausgetretenen, angetrockneten weißlichen Sporenmassen (Abb. 2). In Form und Ausmaßen stimmten diese *Cylindrosporium*-Konidien weitgehend mit denen der amerikanischen Art überein, gleichzeitig aber auch mit den Konidien des in Europa an *Prunus Padus* vorkommenden *Cylindrosporium Padi* Karst. Diesen Pilz, der zur Ordnung der *Melanconiales* der Fungi imperfecti gerechnet wird, beschrieb KARSTEN (1) erstmalig im Jahre 1884 an Blättern von *Prunus Padus*. ERIKSON (10) beobachtete ihn im gleichen Jahre als schweren Blattschädling an Sämlingen der genannten Wirtspflanze, während ALLESCHER (1) ihn 1895 in Bayern auch an unreifen *Padus*-Früchten nachgewiesen hat. Nach ADERHOLD (1) ist *Cylindrosporium Padi* Karst. jedoch schon vor KARSTEN wiederholt an *Prunus Padus* in Europa gefunden worden, nur hatte man ihn fälschlicherweise als Pyknidienpilz zur Ordnung *Sphaeropsidales* gestellt. Dieser Irrtum kann, wie bereits ADERHOLD betonte,

vorkommen, weil besonders die jungen, von der Epidermis überdeckten Sporenlager bzw. Acervuli das Vorhandensein von Pykniden vortäuschen können.

Auch in den USA. ist die *Cylindrosporium*-Krankheit anfänglich nicht immer richtig bestimmt worden. So berichtet Arthur (1) 1886 über ein Schadauftreten von „*Septoria cerasina* (Peck)" an Steinobst, besonders an Süß- und Sauerkirschen. Im Jahre 1891 verwies dann aber Pammel (1) auf einen möglichen Zusammenhang dieser Krankheit mit *Cylindrosporium Padi* Karst. Arthur hatte damals an den befallenen *Prunus*blättern neben der „*Septoria*" noch eine kleinsporige *Phoma spec.* und eine Apothecienform beobachtet, ohne sie jedoch näher einzuordnen. Als Erster stellte Higgins (14, 15) 1913 und 1914 durch Kultur- und Infektionsversuche in Verbindung mit mikroskopischen Untersuchungen fest, daß es sich bei den Apothecien um die höhere Fruchtform von *Cylindrosporium* handelt. Im Verlauf seiner Arbeit isolierte er von Steinobst nicht nur eine, sondern drei auch hinsichtlich ihrer Wirtspflanzen unterscheidbare Arten. Er gab eine genaue Diagnose der drei Pilze und stellte sie zur Gattung *Coccomyces* der Familie *Phacidiaceae.* Nach Nannfeld (20) ist diese Bestimmung jedoch nicht aufrechtzuerhalten. Auf Grund seiner vergleichenden Studien, die im Jahre 1932 erschienen sind, müssen diese Pilze bei der *Discomyceten*-Familie *Dermateaceae* eingegliedert werden. Er faßte sie zu einer neuen Gattung der Unterfamilie *Drepanopezizoideae* zusammen, die er nach Higgins „*Higginsia*" nannte. *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. mit der Konidienform *Cylindrosporium hiemalis* tritt nach Higgins nur an *Prunus avium, P. Cerasus* und *P. pennsylvanica* auf. Keitt (16) nennt 1918 in Wisconsin außerdem noch *Prunus Mahaleb* als Wirtspflanze. Von den beiden anderen Arten befällt *Higginsia prunophorae* (Higg.) Nannf. *(Cyl. prunophorae) Prunus domestica, P. Armeniaca, P. insititia, P. americana* und *P. spinosa* (?), während *Higginsia lutescens* (Higg.) Nannf. *(Cyl. lutescens)* an *Prunus serotina, P. virginiana* und auch an *P. Mahaleb* beobachtet wurde. Bei letzteren unterscheidet Keitt übrigens zwei Arten, eine an *Prunus serotina* und eine an *P. virginiana.* Westcott (29) gibt für *H. lutescens* außerdem *P. Laurocerasus* als Wirt an. Diese Ergebnisse veranlaßten schon Higgins (15) darauf hinzuweisen, daß die drei Pilze an bestimmte, näher verwandte Wirtspflanzen der Gattung *Prunus* (23) angepaßt sind. So tritt die *Hiemalis*-Art nur an Vertretern der Untergattung *Cerasus* auf, die *Prunophora*-Art dagegen an solchen der Untergattung *Prunophora.* Die *Lutescens*-Art macht insofern eine Ausnahme, als sie wohl die Untergattung *Padus* bevorzugt, gleichzeitig jedoch mit *Prunus Mahaleb* und *P. Laurocerasus* auf je eine Species der Untergattung *Cerasus und Laurocerasus* übergeht. 1933 und 1934 klärte Backus (2, 3) schließlich eingehender als Higgins die sexuellen Vorgänge und Kernverhältnisse bei „*Coccomyces hiemalis*". Unter anderem untersuchte er auch das Verhalten der „Phoma-Sporen", die ebenfalls zu *Higginsia* gehören. Diese Mikrokonidien sind wahrscheinlich funktionslos gewordene Spermatien, da von Backus kein Kernübertritt in die Trichogyne beobachtet werden konnte.

*Higginsia* bzw. *Cylindrosporium hiemalis* ist also seit Mitte der achtziger Jahre des vergangenen Jahrhunderts, d. h. seit rund 65 Jahren als häufiger und gefährlichster Blattschädling im Erwerbsobstbau Nordamerikas an Süß- und Sauerkirschen bekannt. Bei unzureichenden Bekämpfungsmaßnahmen hat sein Auftreten wiederholt zu schweren wirtschaftlichen Schäden geführt. Aber auch in Baumschulen macht er sich bei der Heranzucht von Kirschunterlagen äußerst unangenehm bemerkbar, wenn nicht entsprechend gegen ihn vorgegangen wird. Sein Hauptverbreitungsgebiet befindet sich nach Heald (13) an zwei Stellen: 1. in den Nordstaaten von Nebraska bis zum Atlantik und nach Norden anschließend im östlichen Kanada, 2. im Westen der Staaten in dem feuchten Küstenklima von Kalifornien, Oregon und Washington.

In Europa liegen die Verhältnisse hinsichtlich dieser *Cylindrosporium*-Blattfleckenkrankheit offensichtlich anders. Während in Amerika bereits um 1895 viele der dortigen Wild- und Kultursorten der Gattung *Prunus* einen Befall durch eine der drei verschiedenen *Cylindrosporium*-Arten aufwiesen, war hier nur *Cylindrosporium Padi* Karst. an der Traubenkirsche bekannt, die bekanntlich in Europa und Asien heimisch ist. Erst 60 Jahre später als in den USA berichtet 1945 Darpoux (9) aus Frankreich über ein zum Teil

stärkeres Auftreten dieser Blattfleckenkrankheit an Kulturkirschen. Der erste Fund erfolgte 1942 bei Paris durch ARNAUD. Auf Grund der Arbeiten von HIGGINS nahm er an, daß es sich wahrscheinlich um *Cylindrosporium* bzw. *Coccomyces hiemalis* handele. Im nachfolgenden Jahre wurde der Pilz bei Paris und bei Lisieux (Normandie) in Baumschulen, ferner bei Chevry-Cossigy (Seine-Marne) ermittelt und schließlich 1945 in der Nähe von Angers und Toulouse. DARPOUX glaubt, daß die Krankheit schon vor 1942 vorhanden war. Als nächster wies dann FISCHER (11) 1946 in der Schweiz auf einen stärkeren Befall von Kirschen in Baumschulen hin. Er vermutet, daß der Pilz, den er zu *Cylindrosporium Padi* Karst. rechnet, infolge eines bisher nur schwachen Auftretens in früheren Jahren übersehen worden ist. 1949 kam schließlich eine Meldung aus Dänemark. Hier bestimmte NEERGAARD (22) den Pilz als *Cylindrosporium* bzw. *Higginsia hiemalis* an Kirschblattmaterial, das ihm aus einer nordseeländischen Baumschule zugestellt wurde. Weitere Ermittlungen ergaben, daß der Pilz sicher schon 1946 in den Baumschulen des ganzen Landes, d. h. auch

Abb. 3. Süßkirschenquartier bei Nürtingen, Anfang September 1951 fast vollständig entlaubt

in Jütland verbreitet war. BLUMER (4) ergänzte 1951 für die Schweiz den Hinweis von FISCHER. Danach findet sich *Cylindrosporium Padi* Karst. seit 1946 regelmäßig in stärkerem Ausmaße an Baumschulbeständen, außerdem aber auch an Hochstämmen in Obstanlagen. Seiner Meinung nach ist die Krankheit bisher oft nicht erkannt worden, weil man sie mit der Schrotschußkrankheit verwechselt hat.

In Westdeutschland dürfte die *Cylindrosporium*-Krankheit nach Mitteilungen aus der Praxis ebenfalls nicht erst 1950 an Süß- und Sauerkirschen aufgetreten sein. Sie ist auch hier in den voraufgehenden Jahren nicht richtig erkannt worden. Nach unserer ersten sicheren Feststellung bei Burgsinn in Oberfranken konnte der Pilz in Baumschulen in der Umgebung von Karlstadt, Heilbronn, Stuttgart, Heidelberg und Worms nachgewiesen werden (Abb. 3). Ebenso fanden wir ihn — aber weniger häufig — im Erwerbsobstbau sowie an Wildkirschen im Odenwald und Schwarzwald. Weiter äußerte sich ein Baumschulbesitzer aus Norddeutschland anläßlich eines Besuches der Baumschule bei Burgsinn dahingehend, daß in ihrem Gebiet die gleichen Krankheitserscheinungen seit mehreren Jahren vorkommen. Auf unseren Hinweis konnte dann die Bezirksstelle des Pflanzenschutzamtes Kiel in Pinneberg das Auftreten der Krankheit für Schleswig-Holstein bestätigen. Einem kurzen Hinweis der Obstbauversuchsanstalt der Landwirtschafts-

kammer Hannover in Jork (6) ist zu entnehmen, daß die Krankheit sicherlich auch westlich der Elbe schon längere Zeit vor allem in Baumschulen vorhanden ist. Ebenso tritt der Pilz laut einer brieflichen Mitteilung in den übrigen Teilen Niedersachsens auf. Und schließlich liegt aus Bayern (24) ein Bericht über Schäden durch „*Coccomyces hiemalis*" vor, der auf unsere Notiz im Nachrichtenblatt (27) bezug nimmt. In erster Linie sind dort gleichfalls Baumschulen in Mitleidenschaft gezogen worden. Danach kann man mit einer weitgehenden Verbreitung der *Cylindrosporium*-Krankheit auch in Westdeutschland rechnen.

Für das stärkere Auftreten der Blattfleckenkrankheit in den genannten Ländern seit den dreißiger bzw. vierziger Jahren können die üblichen Witterungseinflüsse wohl kaum von ausschlaggebender Bedeutung gewesen sein, da der Pilz dann sicherlich wenigstens seit 1884 häufiger an Kirschen in Europa aufgefallen wäre. Zudem ist er jetzt z. B. bei verhältnismäßig feuchtem und trockenem Wetter (24, 9) festgestellt worden. Auch eine Einschleppung der seit 1886 in den USA stark pathogenen *Hiemalis*-Art dürfte nicht in Betracht kommen, da das fast gleichzeitige Auftreten in den vier europäischen Ländern dagegen spricht. Es fehlt, soweit sich die Sachlage beurteilen läßt, die typisch epidemische Ausbreitung von einem ersten Befallsgebiet. Als Ursache bleibt danach vor allem die Möglichkeit, daß der Pilz *Cylindrosporium Padi* Karst., der nach den vorliegenden Funden zunächst ganz auf *Prunus Padus* spezialisiert war, zur Bildung einer an Kirschen virulenten Form übergegangen ist.

Zur Frage des Entstehens neuer Formen bei „*Coccomyces hiemalis*" äußert sich in den USA Magie (18). Er arbeitete mit zahlreichen Herkünften von Sauerkirschen in Einsporkultur und beobachtete u. a. Sporengröße, Myzelfarbe und Pathogenität. In der Beurteilung seiner Versuchsergebnisse aus dem Jahre 1935 ist er sehr vorsichtig und glaubt, daß nur im Zusammenhang mit den von Backus (2) vereinzelt festgestellten zwei- bis sechskernigen „Riesenascosporen" Aufspaltungen eintreten können. Hinsichtlich *Cylindrosporium Padi* Karst. denkt übrigens bereits Aderhold (1) an die Möglichkeit, daß dieser Pilz, der an *Prunus Padus*[1]) in Ost- und Westdeutschland, u. a. in Schlesien und Baden, sodann in Frankreich, Österreich-Ungarn, Dänemark, Schweden und Finnland gefunden wurde, im Laufe der Zeit auf Steinobst übergehen würde. Die Angabe von Erikson (10), daß *Cylindrosporium Padi* Karst. im Jahre 1884 in einer Baumschule bei Stockholm Sämlingsbeete vernichtet habe, bezieht sich nicht, wie vielfach angenommen wird, auf Kirschen, sondern auf Sämlinge von *Prunus Padus*. Auch bei Richter (24) kommt dies nicht klar zum Ausdruck.

Zu der weiteren Frage, ob *Cylindrosporium Padi* Karst. mit der amerikanischen Form identisch ist, nimmt Aderhold (1) ebenfalls Stellung. Da er an einem Exsikkat aus USA keine wesentlichen morphologischen Unterschiede bei den Acervuli und Konidien ermitteln konnte, vermutete er, daß dort die gleiche Pilzart vorliegt. Soweit jetzt an Süß- und Sauerkirschen in Europa Sporenmessungen durchgeführt worden sind, ergaben sich auch an diesen neuen Wirtspflanzen fast die gleichen Ausmaße wie bei *Cylindrosporium hiemalis*. Da sich aber die Größe der Konidien bei den drei amerikanischen *Higginsia*-Arten weitgehend überschneidet (15, 18), ist eine Entscheidung nach ihnen allein, wie auch Higgins (15) betont, unsicher. Kulturversuche auf Agar führte Aderhold (1) nicht durch, da der Pilz auf Kirschblattdekokt kein nennenswertes Myzelwachstum aufwies. Diese Beobachtung deckt sich mit den späteren Erfahrungen von Higgins (15) und Magie (18). Letzterer stellte 1935 unter anderem bei „*Coccomyces hiemalis*" fest, daß ein geringer Zusatz von

[1]) Higgins (15) nimmt irrtümlich an, daß *Cylindrosporium Padi* schon lange vor 1914 in Europa an Süßkirschen als Schädling vorkam.

Malzextrakt zur Nährlösung das Wachstum wesentlich verbessert; so nimmt er an, daß der Pilz bald nach der Keimung Vitamine oder ähnliche Stoffe zum Weiterwachstum benötigt. BLUMER und KUNDERT (5) bestätigten durch ihre Versuche im Jahre 1950, daß eine Vitamin $B_1$-Heterotrophie vorliegt, wobei sie im Verhalten ihres *„Cylindrosporium Padi"*-Stammes von Kirschen aus der Schweiz und einer Reinkultur von *„Coccomyces hiemalis"* aus Baarn gegenüber Aneurin und seinen beiden Komponenten keinen wesentlichen Unterschied fanden.

Einsporkulturen auf Kartoffelsaftagar, die von Sporenmaterial aus verschiedenen Baumschulen Süddeutschlands gewonnen wurden, stimmen hinsichtlich Wuchsform, dunkler Myzelfarbe und Sporenbildung mit den Angaben von HIGGINS (15) über *„Coccomyces hiemalis"* gut überein. NEERGAARD (21) kam in Dänemark zu dem gleichen Ergebnis, so daß danach eine Zugehörigkeit zu der in Kultur kohlschwarzen *Higginsia prunophorae* und der weißlichen *H. lutescens* ausschalten würde. Die Myzelfarbe scheint jedoch bei den *Higginsia*-Arten auf Agarnährboden ebenfalls stärker zu variieren. So fand MAGIE (9) bei *„Coccomyces hiemalis"* Herkünfte, deren Myzel weiß, fleisch- oder orangefarben, heller oder dunkler braun bzw. schwarz war. Die Hauptfruchtform der *Cylindrosporium Padi*-Formen, die eine Bestimmung ohne weiteres ermöglichen würde, ist aber bisher in Europa weder an *Prunus Padus* noch an Kirschen nachgewiesen worden, so daß die Fähigkeit, Apothecien zu bilden, unter Umständen überhaupt nicht vorhanden ist. Statt dessen fand DARPOUX (9) im Frühjahr an Stelle der Apothecienbildung nur eine Weiterentwicklung der vorjährigen Acervuli-Stromata zu 250 bis 300 $\mu$ großen, dunkel gefärbten pyknidienähnlichen Gebilden, deren Sporen er „Winterkonidien" nannte (Abb. 4).

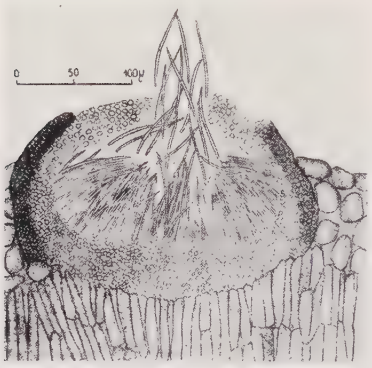



Abb. 4. Querschnitt durch pyknidienähnliches Fruchtgehäuse mit „Winterkonidien" (n. DARPOUX, 1945)

Die *Cylindrosporium*-Form an Kirsche in Europa unterscheidet sich demnach von der *Hiemalis*-Art in Nordamerika besonders in zwei Punkten: 1. im wesentlich späteren Auftreten als Schädling an *Prunus avium* und *Cerasus*, 2. im Fehlen der höheren Fruchtform. Bis zur Klärung dieser vor allem systematisch bedeutsamen Fragen dürfte es sich empfehlen, den Erreger der Blattfleckenkrankheit bei Kirschen in Europa zunächst nicht als *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. zu bezeichnen, sondern als *Cylindrosporium Padi s. l.*, da sich der Pilz heute noch nicht mit Sicherheit als Biotyp von *Cylindrosporium Padi* Karst. bzw. als *Hiemalis*-Form oder gar als eine neue Art in die Gattung *Higginsia* einordnen läßt.

Die Kirschblattkrankheit wird in Amerika meist als *leaf spot* bezeichnet, da hierdurch das in jedem Krankheitsstadium vorhandene Merkmal betont wird. Außerdem nennt man sie aber auch *leaf drop*, *leaf yellow* oder nur *yellow* bzw. *shot-hole disease*, je nachdem, welches Krankheitsbild gerade vorherrscht. In Frankreich wählte DARPOUX (9) den Ausdruck Anthraknose, während die Schweiz (4) die Bezeichnung Sprühfleckenkrankheit verwendet und Dänemark (21) wie in den USA Blattfleckenkrankheit. Da es in Deutschland bei anderen Krankheiten auch gebräuchlich ist, sie mit dem lateinischen Namen des Erregers zu benennen, könnte man in diesem Falle zur Kennzeichnung von *„Cylindrosporium*-Krankheit" sprechen. Weiterhin wird

„Blattüpfelkrankheit" vorgeschlagen, um dadurch das Bild der Blattflecken hinsichtlich ihrer Größe und der Vorwölbung der Sporenlager zu charakterisieren. Blattfallkrankheit dürfte nicht zweckmäßig sein, da durch die Schrotschußkrankheit ebenfalls ein verfrühter Blattfall bei Kirschen verursacht wird.

## II. Biologie und Bekämpfung in den USA sowie Sortenanfälligkeit

Im folgenden sollen zweckmäßigerweise die wesentlichen amerikanischen Beobachtungen und Erfahrungen über die Blattfleckenkrankheit durch *Higginsia hiemalis* an Süß- und Sauerkirschen wiedergegeben werden (3, 7, 13, 15, 18, 28).

Ab August — jedenfalls vor dem Abstoßen der Blätter — beginnen die Acervuli an Stelle der *Cylindrosporium*-Konidien Mikrokonidien bzw. Spermatien abzuschnüren. Gleichzeitig entstehen unter den Sporenlagern im Blattgewebe als erste Anfänge der Apothecien dichte Myzelgeflechte und in ihnen bis zwölf schraubig gewundene, hyphenförmige Ascogone aus acht bis zwölf einkernigen Zellen. Die Trichogyne jedes Ascogonknäuels wächst in das Spermatienlager ein, wo zahlreiche Spermatien an ihm haftenbleiben. Ein Kernübertritt ist aber, wie schon gesagt, bisher nicht beobachtet worden. Die sich bildenden Apothecien-Stromata nehmen schließlich den ganzen Raum zwischen der unteren und oberen Epidermis ein und beenden nach dem Blattfall ihre Vorwinterentwicklung damit, daß ihre Rindenzellen zum Schutz dicke, dunkel gefärbte Wände bekommen. Im Frühjahr ab März, sobald es etwas wärmer wird, geht dann die saprophytische Entwicklung mit der Ausbildung des Hymeniums auf der Blattseite weiter, auf der sich das Sporenlager befunden hatte. Liegt das Blatt mit dieser Seite jedoch dem Boden auf, so unterbleibt die Ascusbildung (15). Im April/Mai reifen die Asci und reißen durch ihr Wachstum die Deckschicht über dem Hymenium mehr oder weniger sternförmig auf. Die langgestielten, keulenförmigen Asci enthalten im oberen Ende zusammengedrängt acht hyaline, gerade bis schwach gekrümmte, 0 bis 2 septierte Ascosporen, die 30—50 × 3,5—4,5 $\mu$ groß sind. Die kugligen bis eiförmigen Apothecien (Abb. 5) haben eine dunkelbraune bis schwärzliche Färbung, während das Hymenium, dessen dünne verzweigte Paraphysen an den Enden häufig hakenförmig und verdickt sind, grau bis fleischfarben ist.

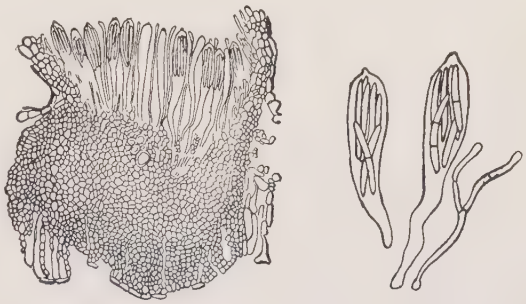


Abb. 5. Querschnitt durch Apothecium von *Higginsia hiemalis* in Süßkirschenblatt mit Epidermisresten auf beiden Seiten. Im Stroma mitten unter dem Hymenium noch erhaltene Blattadergefäße. Rechts: Asci und Paraphyse vergrößert (n. Higgins, 1914)

Das Herausschleudern der Ascosporen ist selbstverständlich auch bei *Higginsia* von Feuchtigkeit und Temperatur abhängig. Eine gründliche Durchfeuchtung der Blätter ist Vorbedingung. In Wisconsin beginnt das Ausstoßen der Ascosporen nach ausreichenden Regenfällen in der Regel vor der Blüte und erstreckt sich über sechs bis sieben Wochen. Der Höhepunkt fällt gewöhnlich auf Anfang Juni. Zwischen 1 und 8 ° C ist der Sporenflug sehr gering, bei 12 ° C mittelstark und ab 16 ° C sehr stark. In den entleerten Apothecien kommt es anschließend noch zur Bildung von Konidien, die mit 50—80 × 2,5—4 $\mu$ (s. S. 396) durchschnittlich länger werden als die Sommerkonidien. Ihre Bedeutung für die Ausbreitung des Pilzes ist noch nicht geklärt. Hinsichtlich dieser Unterschiede in der Sporengröße konnte Magie (18) in Infektionsversuchen feststellen, daß die Konidien bei 14 ° C und täglich vier Stunden Licht länger wurden als bei 24 ° C und zwölfstündiger Belichtung (40 bis 80 $\mu$ und 30 bis 65 $\mu$).

Die Ascosporen verursachen im Frühjahr die nicht sehr zahlreichen Primärinfektionen, und so findet man anfänglich an den Blättern nur vereinzelt kleine punktförmige, violettrote Flecken, die leicht zu übersehen sind. An ihnen entstehen die ersten *Cylindrosporium*-Sporenlager (Abb. 6), deren Konidien wie üblich durch Regen, Wind und Insekten, vor allem in den Baumkronen selbst weiterverbreitet werden. Da sich in den Acervuli ganz erhebliche Mengen von Sporen bilden, führen erst die Sekundärinfektionen durch die *Cylindrosporium*-Konidien zu den späteren schweren Blattschädigungen. Besonders wenn günstige feuchtwarme Wetterperioden mehrere Infektionsschübe ermöglichen, sind die Blätter bald von den kleinen violettroten Flecken wie übersät. Im Höchstfall erreichen diese einen Durchmesser von 3 mm und werden später rotbraun oder braun und fließen vielfach zusammen. Weiterhin vergilben die grünen Blattpartien zwischen den Flecken, worauf die Blätter vorzeitig abfallen, bei sehr schwerer Erkrankung schon im Juli.

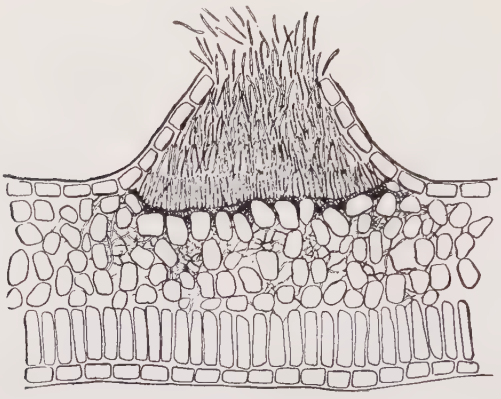


Abb. 6. Querschnitt durch ein Kirschblatt mit Konidienlager von *Cylindrosporium hiemalis* (n. STEWART, 1914)

Die Keimschläuche der Ascosporen und der *Cylindrosporium*-Konidien dringen durch die Spaltöffnungen der Blattunterseite ein. Das Myzel wächst hier interzellular weiter und bildet von Epidermis zu Epidermis ein lockeres Hyphengeflecht mit Haustorien. Dabei übt der Pilz keine stark toxische Wirkung auf die Blattzellen aus, so daß diese allmählich absterben. Je nach der Temperatur kommt es bereits nach ein bis zwei Wochen zur Anlage der Sporenlager unterhalb der Epidermis. Infolge der sich bildenden Sporenmassen wölbt sich die Epidermis schildförmig vor, so daß zuweilen ein Schildlausbefall vermutet wird. Die meisten Acervuli finden sich auf der Blattunterseite. In einem bestimmten Reifestadium reißt die Epidermis unter dem Druck der Konidienmassen auf. Nach Regenfällen quellen die Konidien dann hervor und breiten sich nach und nach auf der feuchten Blattoberfläche aus. Die Sporenmassen bilden hier angetrocknet einen weißlichen Belag. Die Konidien entstehen an kurzen Traghyphen, sind 45—65 × 2,5—4 $\mu$ groß, hyalin, fadenförmig, gerade oder gekrümmt bzw. gewunden und haben 0 bis 2 Querwände[1]). Ihre Keimung ist bis 12° C gering, bei 16° C steigt sie beträchtlich an, um bei 28° C auch das Maximum für das Keimschlauchwachstum zu erreichen. Bei 32° C erfolgt keine Keimung mehr. Trockene Witterung führt bald zu einer Abnahme der Keimfähigkeit bzw. zu ihrem völligen Verlust, wenn ein Monat lang keine Niederschläge eintreten. Eine Überwinterung dieser *Cylindrosporium*-Konidien findet nicht statt.

Gelegentlich werden außer den Blättern auch die Fruchtstiele und Früchte befallen, manchmal sogar die Triebe. Der Hauptschaden entsteht jedoch in jedem Falle durch die mehr oder weniger weitgehende Zerstörung der Blattfläche in Verbindung mit dem vorzeitigen Blattabwurf. Hierdurch leidet die Holz- und Knospenreife und damit der Fruchtansatz des folgenden Jahres. Bei sehr zeitiger und starker Erkrankung wird aber auch die Ernte desselben Jahres durch schlechtes Ausreifen der Früchte in Mitleidenschaft gezogen. Die nicht ausgereiften Triebe sterben im Herbst oder über Winter ab, wie überhaupt kranke Bäume frostempfindlicher sind. Sie gehen bei jährlich starkem Befall oft schon innerhalb von drei Jahren ein.

Erwähnt sei noch, daß die *Higginsia*-Arten in Amerika an Steinobst einen Schußlocheffekt hervorrufen können. Während *Higginsia prunophorae* diese Erscheinung an

[1]) Fusarium-ähnliche Konidien kommen nicht vor. Bei GÄUMANN (12) ist eine Abbildung von BACKUS (3) unrichtig ergänzt worden.

Pflaumenblättern regelmäßig verursacht, kommt es durch *Higginsia hiemalis* meist nur bei Sauerkirschen zu einem Herausfallen der abgestorbenen Blattpartien. Bei „*Cylindrosporium Padi*" beobachtete FISCHER (11) dieses Krankheitsbild ganz selten, in Frankreich, Dänemark und Süddeutschland konnte noch kein Fall beobachtet werden. Übrigens war an unserem Untersuchungsmaterial häufiger gleichzeitig der Erreger der Schrotschußkrankheit *Clasterosporium carpophilum* (Lév.) Aderh. vorhanden. Die Blattflecken durch *Clasterosporium* unterscheiden sich vor allem durch das frühzeitige Absterben und Eintrocknen des befallenen Gewebes und durch das Fehlen der Acervuli.

Ungünstige Standorte und mangelhafte oder falsche Ernährung der Bestände fördern das Auftreten der *Cylindrosporium*-Krankheit, insbesondere das Abfallen der Blätter. Die sehr frühzeitige und starke Erkrankung der Kirschensämlinge an der ersten Fundstelle bei Burgsinn in den beiden Jahren 1950 und 1951 dürfte wahrscheinlich durch ungünstige Boden- und Ernährungsverhältnisse mitbedingt sein, da die Bodenuntersuchung einen Mangel an Kalk, Kali, Phosphor und an Humusbestandteilen ergab.

In Amerika hat man ferner eine verschiedene Anfälligkeit der Edelsorten gegenüber *Higginsia hiemalis* festgestellt. Auch Sämlinge von Wildkirschen wiesen in USA je nach Herkunft eine unterschiedliche Widerstandsfähigkeit auf (8, 25). Ebenso fand DARPOUX (9) in Frankreich und NEERGAARD (21) in Dänemark bei den Kirschsorten eine ungleiche Empfindlichkeit gegenüber *Cylindrosporium Padi* s. l. und BLUMER (4) in der Schweiz bei vegetativ vermehrten Kirschunterlagen. Die von uns untersuchten Kirschsämlinge zeigten vereinzelt Unterschiede in der Befallsstärke und im Befallsbild. So waren bei einigen die Blattflecken deutlich größer und intensiver gefärbt, bei anderen hatten sich die Acervuli statt auf der Blattunterseite, hauptsächlich auf der Oberseite ausgebildet.

Die Bekämpfung von *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. ist in den USA weitgehend geklärt. Es sind im Erwerbsobstbau meist vier Spritzungen erforderlich: 1. so zeitig wie möglich in die abgehende Blüte, 2. zur Zeit, wenn der Kelch noch um die jungen Früchtchen sitzt, man könnte sagen während des „Kelchringstadiums", 3. zehn Tage nach dem Abfallen des Kelchringes und 4. nach der Ernte (28). Die ersten Spritzungen sind ähnlich wie beim Apfelschorf zur Verhinderung der Primärinfektionen durch die Ascosporen besonders wichtig. In den Baumschulen soll mit der Behandlung begonnen werden, wenn die Triebe 18 bis 25 cm lang sind. Jedenfalls muß auch hier die Zeit des Ascosporenfluges berücksichtigt werden. Die Spritzungen sind dann bis zur Beendigung des Wachstums in 14tägigem Abstand zu wiederholen. Als zusätzliche Maßnahme wird in jedem Falle das Unterpflügen der Blätter bis spätestens April genannt.

Zur Bekämpfung empfiehlt man kupfer- und schwefelhaltige Mittel. Aber auch Fermate, Dithane, Zerlate und andere neue organische Fungizide (19) haben Erfolge zu verzeichnen. Mit dem Antibioticum Actidion, das bei der Herstellung von Streptomycin anfällt und eine ausgesprochene antimycotische Wirkung besitzt, gelang es mit einer Spritzung Ende August *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. in 99 % der Blattflecken abzutöten. Mit anderen Präparaten war der Erfolg schlechter. Das Actidion stoppte den Blattfall bei 20 %, so daß die behandelten Bäume in der Folge verhältnismäßig grün blieben, während die unbehandelten völlig entlaubt wurden (22). Je nach der Stärke des Auftretens der „*leaf spot*" genügen gebietsweise Schwefelpräparate. In anderen Lagen wird dagegen erst mit Schwefel-, nach der Ernte aber mit Kupfermitteln gespritzt. Schließlich gibt es Gebiete, in denen man bei allen Behandlungen Schwefel-Kupfergemische bzw. nur Kupfer einsetzt, wobei zur Ernte hin geringere Konzentrationen angewandt werden, um nach Möglichkeit Pflanzenschädigungen zu vermeiden. Bordeauxbrühe ist in feuchten Lagen besonders bei Süßkirschen (13) mit Vorsicht zu benutzen, da sie neben ernsthaften Blattverbrennungen auch eine beachtliche Minderung des Fruchtwertes verursachen kann: der Fruchtertrag wird durch ein Kleinbleiben der Früchte herabgesetzt und außerdem leidet die Farbausbildung und Festigkeit der Früchte (17). Spritztechnisch ist zu beachten, daß die Blattober- und -unterseiten getroffen werden.

## III. Biologie und Bekämpfung in Europa

Das Krankheitsbild an Kirsche stimmt in Europa weitgehend mit dem in Nordamerika überein. Ein Unterschied besteht jedoch hinsichtlich der allgemeinen Befallsstärke. Während amerikanische Obstanlagen und Baumschulquartiere in gleicher Weise gefährdet sind, tritt hier die *Cylindrosporium*-Krankheit bisher besonders häufig und stark in Baumschulbeständen auf. Zudem weisen DARPOUX (9) und BLUMER (4) darauf hin, daß bei Hochstämmen die unteren Äste oft früher und heftiger erkranken als die übrigen Teile der Krone. Da die Primärinfektionen nicht wie bei *Higginsia* auf einen Ascosporenflug zurückgehen, können die genannten Befallsunterschiede mit der geringeren Ausbreitungsmöglichkeit der Konidien zusammenhängen. Auch bei den *Fusicladium*-Pilzen ist der Konidienflug auf die Baumkronen und die nächste Umgebung beschränkt. Hinzu kommt, daß die stets höhere Luftfeuchtigkeit innerhalb der relativ dichten Baumschulbstände die Befallsstärke steigern wird.

Hinsichtlich der Bekämpfung von *Cylindrosporium Padi* s. l. liegen meines Wissens bisher nur in Frankreich und der Schweiz Ergebnisse vor. DARPOUX (9) gibt an, daß er mit einer Spritzung Anfang Mai gleich nach der Blüte und einer zweiten etwa fünf Wochen später einen guten Erfolg erzielte. Zur Anwendung gelangte eine einprozentige Bordeauxbrühe. Die Spritzversuche von BLUMER (4) in der Baumschule der Versuchsanstalt von Wädenswil an Kirschunterlagen mit einem Netzschwefel und einem Karbamat unterstreichen die Bedeutung einer rechtzeitigen Behandlung. Eine zu späte Spritzung bringt kein befriedigendes Ergebnis. Für die Schweizer Verhältnisse erachtet BLUMER in Baumschulen drei Spritzungen für ausreichend: die erste Anfang Juni und die zwei folgenden im Abstand von vier bis fünf Wochen. In beiden Fällen liegt somit die Anzahl der Behandlungen niedriger als in den USA. Wo bei uns in den letzten Jahren bereits im Juni ein stärkerer Befall beobachtet worden ist, wird man sich vorsichtshalber besser nach den oben genannten amerikanischen Empfehlungen richten und vor allem in Baumschulen die erste Spritzung vorbeugend schon im Mai durchführen. Besteht jedoch die Möglichkeit, durch regelmäßige und genaue Beobachtungen den Beginn der Primärinfektion an den Blättern zu ermitteln, so kann man die erste Behandlung bis zu diesem Zeitpunkt hinausschieben.

Der Befallsbeginn scheint übrigens nach den vorjährigen Ermittlungen in Südwestdeutschland gegenüber Nordamerika durch das Fehlen der Ascosporen nicht wesentlich verzögert zu sein. Es müssen also schon im Mai Konidien auftreten, die die Rolle der Ascosporen übernehmen und Primärinfektionen hervorrufen. Wie bereits erwähnt, kommen hierfür die von DARPOUX (9) nachgewiesenen „Winterkonidien" in Frage. Nach seiner Feststellung entwickeln sich an den abgefallenen Blättern im Frühjahr die Stromata der vorjährigen Acervuli saprophytisch zu 250 bis 300 $\mu$ großen pyknidenähnlichen dunkel gefärbten Fruchtkörpern weiter. Die in ihrem Innern gebildeten Ko-

nidien, die wie die „Apothecienkonidien" in Amerika (15) länger, aber auch schlanker sind (60 bis 80 × 2 $\mu$), reiften Mitte Juni. Dieser Zeitpunkt deckt sich mit dem anscheinend späteren Befallszeitpunkt in Frankreich, wo die Krankheit meist erst Ende August/Anfang September deutlicher in Erscheinung tritt. Es ist aber auch möglich, daß in dem Versuch die Reife der „Pykniden" verzögert war, weil man das Blattmaterial in einem Beutel verhältnismäßig trocken und warm im Schutz der Südseite einer Mauer über Winter aufbewahrt hatte. Jedenfalls müssen bei uns die Konidien schon früher vorhanden sein. Außerdem scheint nach neueren französischen Beobachtungen (30) auch eine Überwinterung an befallenen Trieben vorzukommen, was in den USA nur sehr selten der Fall ist. Sollte sich dies bestätigen, wäre als zusätzliche Bekämpfungsmaßnahme neben dem rechtzeitigen Unterpflügen der Blätter auch ein Rückschnitt der Triebe zu empfehlen. Ferner kann man, wo die Möglichkeit besteht, *Prunus Padus* in der unmittelbaren Nähe von Baumschulen bzw. Kirschanlagen vorsichtshalber beseitigen lassen. Ob dieser Maßnahme tatsächlich eine Bedeutung zukommt, muß allerdings noch durch entsprechende Beobachtungen und Infektionsversuche geklärt werden.

Als Spritzbrühe wird man entsprechend den Erfahrungen bei der Schorfbekämpfung am besten ein Schwefelpräparat unter Zusatz der üblichen Menge eines hochprozentigen Kupfermittels verwenden, um bei kupferempfindlichen Sorten Blatt- und Fruchtschädigungen zu vermeiden. Wenn auch für *Cylindrosporium Padi s. l.* in Europa noch nicht alle systematischen und biologischen Einzelheiten klarliegen, so ist die Bekämpfung vor allem durch die langjährigen Erfahrungen in den USA doch als so weit gesichert anzusehen, daß jeder Obstbauer und besonders auch jeder Baumschuler Schäden vermeiden kann. Er darf nur die neue Belastung nicht scheuen und muß die erforderlichen Gegenmaßnahmen rechtzeitig und planmäßig durchführen.

---

## Zusammenfassung

1. Im Mai 1951 konnte an Kirschsämlingen aus einer Baumschule in Oberfranken eine pilzliche Blattfleckenkrankheit durch eine *Cylindrosporium*-Art festgestellt werden, über die in Deutschland bisher noch nicht berichtet worden war.

2. Wir fanden die Krankheit danach 1951 in zahlreichen Betrieben, vorwiegend in Baumschulen, an Süß- und Sauerkirschen, im Odenwald und Schwarzwald auch an Wildkirschen. Nachgewiesen ist sie in Württemberg-Baden, Bayern, Niedersachsen und Schleswig-Holstein, so daß man mit einer weitgehenden Verbreitung in Westdeutschland rechnen kann. Meldungen über stärkere Schäden liegen bereits aus Frankreich (1945), der Schweiz (1946) und Dänemark (1949) vor.

3. Nach den angestellten Ermittlungen tritt die Blattfleckenkrankheit nicht erst seit 1950/51 in Westdeutschland auf, sondern schon seit einer ganzen Reihe von Jahren. Auch in Frankreich, der Schweiz und in Dänemark ist man der Ansicht, daß der Pilz bereits vor seiner ersten Feststellung vorhanden war. Er wurde nur nicht richtig bestimmt oder aber infolge schwächeren Befalls nicht beachtet.

4. Die Krankheitssymptome stimmen weitgehend mit der sogenannten *leaf spot* an Kirschen in Nordamerika überein und außerdem mit einer an *Prunus Padus* in Europa beobachteten Blattfleckenkrankheit, die beide schon um 1885 erstmalig genauer beschrieben wurden.

5. Erreger der *leaf spot* ist die *Discomyceten*-Art *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. mit der Konidienform *Cylindrosporium hiemalis*. Bei *Prunus Padus* handelt es sich um den Pilz *Cylindrosporium Padi* Karst. An letztgenannter Wirtspflanze und an Kirsche ist in Europa dagegen noch keine höhere Fruchtform nachgewiesen worden. In Frankreich hat man an überwinterten Blättern nur *Cylindrosporium*-Konidien in pyknidenähnlichen Gehäusen gefunden.

6. Die morphologischen und physiologischen Merkmale der drei *Cylindrosporium*-Formen werden besprochen.

7. Der Befall der Kirschen in Europa hängt wohl kaum mit einer Einschleppung der pathogenen *Higginsia* bzw. *Cylindrosporium*-Art aus Nordamerika zusammen. Das fast gleichzeitige Auftreten der Krankheit in vier europäischen Ländern spricht gegen eine epidemische Ausbreitung von einer ersten Befallsstelle. Dagegen dürfte die Krankheit eher auf die Bildung einer virulenten Form von *Cylindrosporium Padi* Karst. zurückgehen. Solange die systematische Zugehörigkeit des Pilzes an Kirsche in Europa ungeklärt ist, wird man ihn daher zweckmäßigerweise zunächst nicht *Higginsia hiemalis* (Higg.) Nannf. nennen, sondern *Cylindrosporium Padi s. l.*

8. Als Bezeichnung der Kirschblattkrankheit wird für Deutschland „*Cylindrosporium*-Krankheit" oder „Blattüpfelkrankheit vorgeschlagen.

9. An Hand der vorliegenden ausländischen Literatur und eigener Beobachtungen wird die Biologie und Bekämpfung der *Cylindrosporium*-Krankheiten an Kirschen in Nordamerika und Europa erörtert. Der häufigere und stärkere Befall der niedrigen Baumschulbestände in Europa hängt wahrscheinlich mit dem Fehlen des Ascosporenfluges und der geringeren Ausbreitungsmöglichkeit der Konidien zusammen.

## Literaturverzeichnis


1. Aderhold, R., 1901, Über die Sprüh- und Dürrfleckenkrankheiten (syn. Schußlöcherkrankheiten) des Steinobstes. Landw. Jahrbücher **30**, 770—830.
2. Backus, M. P., 1933, The development of the ascus and the occurence of giant ascospores in *Coccomyces hiemalis*. Bull. Torrey Bot. Club **60**, 611—632.
3. — —, 1934, Initiation of the ascocarp and associated phenomena in *Coccomyces* hiemalis. Contrib. Boyce Thompson Inst. **6**, 339—379.
4. Blumer, S., 1951, Die Bekämpfung der Sprühfleckenkrankheit an Kirschbäumen *(Cylindrosporium padi)*. Schweiz. Ztschr. Obst- u. Weinbau **60**, 505—507.
5. — — und Kundert, J., 1950, Über die Aneurin-Heterotrophie bei *Cylindrosporium padi* Karsten. Schweiz. Ztschr. allg. Pathol. u. Bakteriol. **13**, 580—586.
6. Bömeke, H., 1951, Eine wenig bekannte Krankheit an Kirschen. Mitt. Obstbauversuchsring Jork **6**, 145.
7. Chester, K. St., 1948, Nature and prevention of plant diseases. The Blakiston Company. Philadelphia.
8. Clarke, W. S., 1950, Selected mazzard cherry seedlings leaf spot free. Rep. Pa agric. Exp. Stat. 1948—49 (Bull. 515), 6 u. 8, (Rev. Appl. Myc. **30**, 172. 1951).
9. Darpoux, H., 1945, Etude sur l'anthracnose du cerisier. Ann. Epiphyties **11**, 3—4, 161—175.
10. Erikson, J., 1928, Die Pilzkrankheiten der Garten- und Parkgewächse. Franckh'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart.
11. Fischer, H., 1946, Über einige Krankheiten an Obstbäumen. Schweiz. Ztschr. Obst- u. Weinbau **55**, 495—502.
12. Gäumann, E., 1949, Die Pilze. Verl. Birkhäuser. Basel.
13. Heald, Fr. D., 1943, Introduction to plant pathology. Mc Graw-Still Book Company. New York.
14. Higgins, B. B., 1913, The perfect stage of *Cylindrosporium* on *Prunus avium*. Science **2**, 637—638.
15. — —, 1914, Contribution to the life history and physiology of *Cylindrosporium* on stone fruits. Amer. Journ. Bot. **1**, 145—173.
16. Keitt, G. W., 1918, Inoculation experiments with species of *Coccomyces* from stone fruits. Journ. Agr. Res. **13**, 539—570.
17. Lewis, F. H. u. Groves, A. B., 1948, Control of Cherry leaf spot in Cumberland-Shenandoah Valley. Bull. Pa agric. Exp. Stat. **498**, 40 (Rev. Appl. Myc. **28**, 219. 1949).
18. Magie, R. O., 1935, Variability of monosporic cultures of *Coccomyces hiemalis*. Phytopath. **25**, 131—159.
19. Mills, W. D. u. van Geluwe, J. D., 1951, Field evaluation of glyoxalidine compounds for control of cherry leaf spot. Phytopath. **41**, 466—474.
20. Nannfeld, J. A., 1932, Studien über die Morphologie und Systematik der nicht lichenisierten inoperculaten *Discomyceten*. Nova Acta Reg. Soc. Scient. Upsaliensis. Ser. IV. Vol. **8**. 2, 1—368.

21. Neergaard, P., 1949, Kirsebaerbladpletsyge *(Higginsia hiemalis)* en for Danemark ny, alvorlig kirsebaersygdom. Gartnertidende **65**, 487—489.

22. Petersen, D. u. Cation, D., 1950, Exploratory experiments on the use of actidione for the control of peach brown rot and cherry leaf spot. Plant Disease Reptr. **34**, 5—6 (Rev. Appl. Myc. **29**, 417. 1950).

23. Rehder, A., 1949, Manual of cultivated trees and shrubs. 2. Aufl., 452—455. Verlag Mac Millan, New York.

24. Richter, B., 1952, Stärkeres Auftreten einer Blattfleckenkrankheit an Kirschen, verursacht durch den Pilz *Coccomyces hiemalis* Higg. Pflanzenschutz **4**, 7.

25. Science for the farmer, 1947, Rep. Pa agric. Exp. Stat. 1946—47 (Bull. 488) 57 (Rev. Appl. Myc. **27**, 175. 1948).

26. Sorauer, P., 1932, Handbuch der Pflanzenkrankheiten. Bd. **3**, Teil II, 562—563. Verlag Paul Parey.

27. Thiem, H., 1951, Kurze Mitteilung. Nachrichtenbl. d. Dtsch. Pflanzenschutzd. (Brschwg.) **3**, 174.

28. — —, 1952, Von der Zukunft des deutschen Kirschenanbaues. Bad. Obst- u. Gartenbauer. **5**, 11.

29. Westcott, C., 1950, Plant disease handbook. Verlag D. van Nostrand Company. New York.

30. Viennot-Bourjin, G., 1949, Les champignons parasites des plantes cultivées. Bd. **1**, 648—652. Verlag Masson, Paris.

*Aus der Eidg. Landwirtschaftlichen Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon*
*Direktor: Dr. R. Salzmann*
*Abteilung Züchtung*

# Pilzliche Erreger der Getreideblattdürre

Von

E. Müller

*Mit 6 Abbildungen*

Den Begriff „Getreideblattdürre" verwenden wir bei uns für die durch pathogene Ascomyceten und Fungi imperfecti an Getreide hervorgerufenen vorzeitigen Absterbe-Erscheinungen an den grünen Pflanzenteilen. Mit diesem Begriff wollen wir die physiologischen Vergilbungserscheinungen, die mit dem normalen Abreifen der Pflanzen im Zusammenhang stehen, die wegen Mangel an bestimmten Nährstoffen auftretenden Dürrflecken und die Folgeerscheinungen von starken Mehltau- und Rostinfektionen nicht erfassen.

Auf diese Krankheit wurde man bei uns erst in den letzten Jahren durch die starken Schädigungen im St. Galler Rheintal und in der Linthebene aufmerksam. Diese riefen nach einer eingehenderen Untersuchung, um der Erscheinung in Zukunft einmal mit Hilfe der Resistenzzüchtung entgegentreten zu können. Dabei stehen naturgemäß die Brotgetreidearten, vor allem der Weizen, im Vordergrund des Interesses. Aber es wäre falsch, die anderen Getreidearten vollständig zu vernachlässigen. Für bestimmte Erreger müssen auch darüber hinaus weitere Gramineen in den Kreis der Untersuchung gezogen werden.

Als erstes wurde versucht, ein Inventar der in Frage kommenden Erreger aufzunehmen. Sowohl aus Literaturangaben wie aus eigenen, früheren Erfahrungen stand fest, daß mit einer ganzen Reihe von verschiedenartigen Pilzen gerechnet werden muß (vgl. Zogg, 1950, 1951; Müller, 1950). Im Laufe der Vegetationsperiode 1951 haben wir denn auch eine Anzahl derartiger Pilze isoliert und während des Winters durch Infektionsversuche auf ihre parasitische Eignung geprüft. Zur Infektion wendeten wir folgende Methode an:

In Glastuben (Reagenzgläschen) von 20 cm Länge und 2,5 cm innerem Durchmesser brachten wir 10 $cm^3$ Nährlösung nach Knop und darüber — in Berührung mit der Flüssigkeit — ein Glaswollgeflecht als Träger für die Getreidepflanze. Diese mit einem Wattebausch verschlossenen Tuben wurden sterilisiert und dann in jede Tube ein mit Formalin und Heißwasser gebeiztes und unter sterilen Verhältnissen vorgekeimtes Getreidekorn gegeben. Die

Tuben bewahrten wir in einem Gestell auf, so daß der Wurzelbereich der Pflanzen im Dunkeln blieb. Getreidepflanzen lassen sich auf diese Art ohne weiteres fünf bis sechs Wochen lang ohne Schaden kultivieren.

Nach der Entwicklung des ersten Blattes infizierten wir die Pflanzen. Meist brachten wir die Sporen des Pilzes auf die Blätter. Bei nicht sporulierenden Pilzen mußten wir kleine Myzelstücke auf die Blätter kleben. Mit dieser Methode konnten wir allerdings nicht so gute Erfolge erreichen wie mit der Sporeninfektion, bei der, soweit eine Infektion überhaupt möglich war, alle infizierten Pflanzen auch wirklich erkrankten. Nach Möglichkeit versuchten wir, die Pflanzen so lange aufzubewahren, bis an Hand der entstehenden Fruktifikationen der Erreger nochmals überprüft werden konnte.

Bei der Vorbereitung dieser Versuche ergab sich eine wichtige Nebenfrage. Da man die sichersten Infektionsergebnisse mit Sporeninfektion erhält, sollte man den Pilz so kultivieren können, daß sicher Sporen zur Verfügung stehen. Es ist außerdem sehr schwierig, aus Kulturen, in denen die Hauptfruchtform gebildet wird, die Ascosporen zur Infektion zu gewinnen. Es ist besser, wenn man Konidien zur Verfügung hat. Leider schließen nicht alle Pilze eine Konidiengeneration in ihre Entwicklung ein, und bei anderen kennt man die Bedingungen nicht, unter denen sie Konidien bilden. Die Untersuchungen über die günstigsten Bedingungen für die Sporenbildung nahm denn auch bei einzelnen Pilzen ziemlich viel Zeit in Anspruch.

Mit der beschriebenen Infektionsmethode läßt sich vorderhand nur aussagen, ob ein Pilz überhaupt infizieren kann oder nicht, und ob sich die Infektion unter gleichartigen Bedingungen rasch oder langsam und stark oder schwach manifestiert. Hingegen vermag die Methode die praktische Bedeutung der Erreger, vor allem die Art der Schädigung und die Intensität der Ertragseinbußen nicht abzuklären. Außerdem war es bisher auch nicht möglich, das Problem der Mischinfektionen von zwei und mehr Erregern zu bearbeiten. Aus diesen Gründen soll auf die Infektionsversuche nur kurz eingegangen werden; sie werden bei den einzelnen Pilzen summarisch besprochen, und die folgenden Angaben bezwecken denn auch lediglich, eine Übersicht über die in Frage kommenden Erreger zu geben.

### 1. *Calonectria graminicola* (B. et Br.) Wr.

Synonyme: *Nectria graminicola* B. et Br. — Brit. fungi n. 896, tab. 11.
[1]*Calonectria graminicola* Wr. (non Stevens) — Phytopathology **3**, 34, (1913).
*Calonectria nivalis* Schaffnit — Micol. Centralbl. **2**, 246, (1913).

Nebenfruchtform: *Fusarium nivale* (Fr.) Ces. — in Rbh. Herb. Myc. Ed. I. n. 1439 (1857).

Sowohl auf Weizenmaterial aus dem Kanton Tessin wie auch von unserem Versuchsbetrieb konnten auf frühzeitig abgestorbenen Weizenblättern die Perithezien von *Calonectria graminicola* festgestellt werden, während in beiden Fällen zu diesem Zeitpunkt nur wenige Konidien festgestellt werden konnten. Die Perithezien lassen sich von Auge als kleine dunkelbraune Punkte erkennen. Der aus einer Isolierung hervorgegangene Stamm vermochte im Dunkeln nur auf Weizenmehlagar (20 g Agar-agar + 20 g Weizenmehl auf

1000 ccm Wasser) die Nebenfruchtform *(Fusarium nivale)* zu bilden, während er auf Karottenagar (5 % Karottensaft), Malzagar (2 % Malzextrakt) und Kartoffelagar (5 % Kartoffelpreßsaft) steril wuchs. Unter dem Einfluß von Tageslicht fruktifizierte er auf allen Nährböden gut. Zudem bildet er auf feuchtem, sterilisiertem Stroh auch die Perithezien in großer Zahl (vgl. z. B. SCHAFFNIT, 1912, p. 43).

Morphologisch zeichnen sich die beiden Herkünfte durch das Überwiegen von zweizelligen Sporen aus. Nur ganz selten konnte man auch vierzellige Sporen feststellen. Die Sporengröße schwankt zwischen 12,5 und 17 $\mu$ in der Länge und 3 bis 4 $\mu$ in der Breite. Die Sporen der Nebenfruchtformen sind in ihren Größenverhältnissen ebenfalls ganz im Rahmen der von WOLLENWEBER und REINKING (1935) gegebenen Beschreibung (vgl. z. B. auch SCHAFFNIT, 1920).

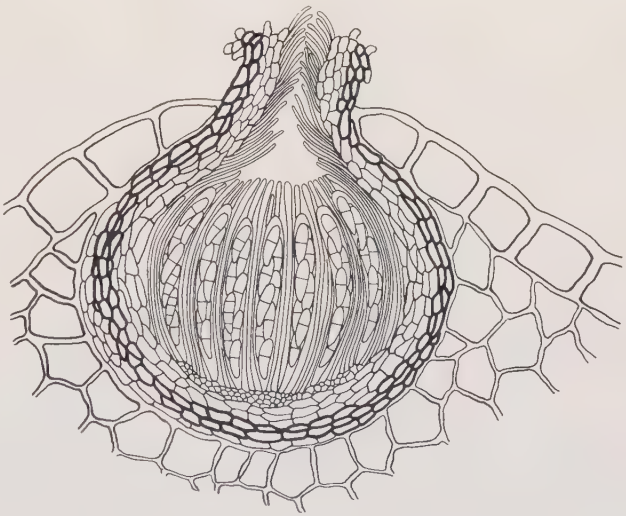


Abb. 1. Schnitt durch einen Fruchtkörper von *Calonectria graminicola.* Vergr. 250mal

Die Infektion mit diesem Pilz manifestierte sich nach sehr kurzer Zeit, bei Temperaturen von 14 bis 18 ° C schon nach vier bis fünf Tagen mit ausbleichenden, später gebräunten Blättern. Von der Infektionsstelle aus breitet sich die Schädigung über das ganze Blatt aus und bringt nicht selten die ganze Pflanze zum Absterben (vgl. z. B. ANLIKER, 1935; WOLLENWEBER und REINKING, 1935; SPRAGUE, z. B. 1950). Dabei wurden Weizen, Hafer, Gerste und Roggen in gleicher Weise befallen.

### 2. *Didymella caudata* nov. spec.

Gegen den Herbst hin trat auf dürren, im Freien aufbewahrten Getreideblättern eine *Didymella*-Art auf, die sich von der im folgenden Abschnitt beschriebenen *Didymella exitialis* durch die bedeutend größeren Fruchtkörper, durch die zahlreicheren, schmäleren, in der Form mehr keuligen Asci und durch die mit hyalinen Anhängseln versehenen Ascosporen sicher unterscheiden läßt. Der Pilz wurde isoliert und in Kultur genommen. Auf Malzagar wächst er mit einem weißen, dicht rasigen Myzel, wobei er die für *Didymella exitialis* typischen Farben vermissen läßt. Unter Lichteinfluß vermag er sowohl auf Malzagar wie auch auf Stroh wiederum die Hauptfruchtform zu bilden. Die Bildung einer Nebenfruchtform konnte dagegen nie festgestellt werden.

Da sich dieser Pilz durch seine mit hyalinen Anhängseln versehenen Sporen relativ leicht charakterisieren läßt, wäre dies in der Literatur jedenfalls aus einer Diagnose ersichtlich gewesen. Da aber in der zur Verfügung stehenden Literatur keine entsprechende Beschreibung zu finden ist, muß diese Form als neu betrachtet werden. Sie läßt sich folgendermaßen beschreiben:

*Peritheciis dispersis, subepidermalibus, globosis, 80—200 μ diam. Ostiolo conico vel cylindraceo, ad verticem setulis brunneis brevis praedito. Pariete perithecii 5—15 μ crasso e cellulis elongatis, membranis crassis, 5—10 μ longis formato. Ascis numerosis, clavatis, 55—70 × 10—12 μ, apice rotundatis vel fusoideis, basi atennuatis, 8-sporis. Sporis ellipsoideis-fusoideis, in media septatis et constrictis, hyalinis, 10,5—13 × 4—4,5 μ, utrinque appendicibus hyalinis, mucosis cylindraceis, 3—4 μ longis praeditis. Paraphysoidibus filiformibus plus minusve cellulatis.*

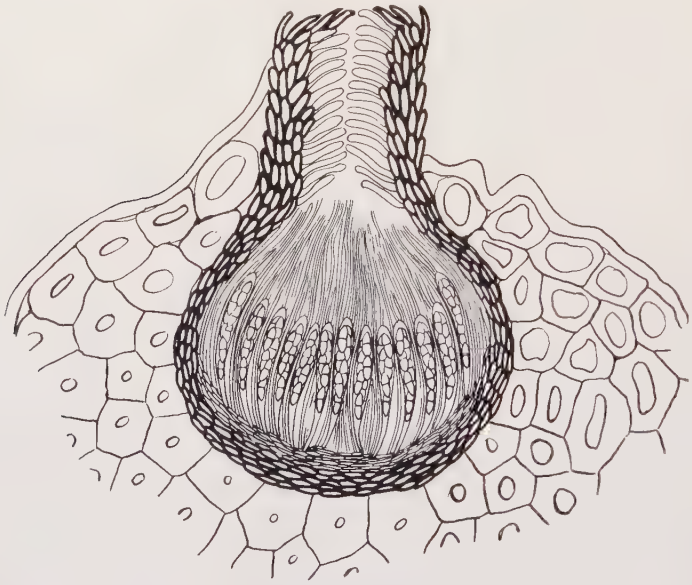


Abb. 2. Schnitt durch einen Fruchtkörper von *Didymella caudata* Vergr. 250mal

*Hab. in foliis et calamis emortuis Tritici vulgaris L. — Helvetia — Eidg. Landw. Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon, 10. 10. 1951.*

Die kugeligen Fruchtkörper entstehen subepidermal und sind 80—200 μ groß. Sie brechen mit einer zylindrischen oder stumpf kegelförmigen Mündung bis an die Oberfläche durch und überragen sie zum Teil. Die Mündung selber ist von einem Porus durchbohrt, in den hinein wagerechte, breite, hyaline Hyphen ragen und ihn durchflechten. Am äußersten Scheitelteil ist er von kurzen, dickwandigen, braunen Borsten umkränzt. Die Fruchtkörperwand besteht aus in mehr oder weniger konzentrischen Schichten angeordneten, langgestreckten, dickwandigen, opakdunkelbraunen, 10—14 μ langen Zellen.

Die zahlreichen keuligen Asci sind am Scheitel oft breit abgerundet, manchmal auch schwach verjüngt, und laufen am Grunde in einen kurzen Stiel aus. Sie messen 55—70 × 8—10 μ und enthalten acht Sporen. Sie werden von zahlreichen, oft zelligen Paraphysoiden umgeben. Die Sporen sind elliptisch-spindelig, beidendig schwach zugespitzt und deutlich eingeschnürt, und sie tragen an beiden Enden ein schwach gekrümmtes, zylindrisches Anhängsel von 3—4 μ Länge. Ihre Farbe ist hyalin, und sie messen 10,5—13 × 4—4,5 μ.

*Didymella caudata* weicht stark von der folgenden Art ab. Sie verkörpert innerhalb der Gattung *Didymella* einen hoch entwickelten Typ, der sich durch die Ausbildung der Mündung und die große Zahl der schmalen, keuligen Asci manifestiert. Er würde im Bereich der Gattung *Leptosphaeria* der Sektion *Nodulosphaeria* entsprechen (vgl. MÜLLER, 1950).

Die mit dem Pilz durchgeführten Infektionsversuche ergaben nur eine ganz schwache Schädigung der infizierten Pflanzen.

### 3. *Didymella exitialis* (Mor.) comb. nov.

Synonyme: *Sphaerella exitialis* Morini — Nuov. Giorn. Bot. It. **18**, (1886). En. Fung. Bol. IV. no. 10.
*Didymella autumnalis* Petr. — Ann. myc. **23**, 111 (1925).
Nebenfruchtform: *Ascochyta sorghi* Sacc. — Fungi. Ven. Ser. II. p. 302 (1877).
Synonyme: *Ascochyta graminicola* Sacc. — Mich. **1**, 127, (1878).
*Ascochyta graminicola* var. *leptospora* Trail. — Grevillea **15**, 109, (1887).
*Ascochyta graminicola* var. *holci* Sacc. — Mich. **2**, 350, (1881).
*Ascochyta graminicola* var. *diedickeana* Baudys et Picb. — Acta Soc. Sci. Nat. Morav. **3**, 36, (1926).
*Ascochyta elymi* Tehon et Daniels — Mycol. **19**, 110, (1927).

Ein sehr häufiger Pilz auf blattdürrekranken Getreidepflanzen ist *Ascochyta sorghi*. Er tritt auf allen Getreidearten auf, und nach SPRAGUE (1950) umfaßt sein Wirtskreis eine größere Anzahl von Gramineen, u. a. auch *Agropyron repens* (L.) Pal., *Bromus tectorum* L., *Dactylis glomerata* L. und *Festuca rubra* L. Der Pilz verursacht anfänglich gelbliche, von einem bräunlichen Rand umgebene Blattflecken; später werden diese zu nekrotischen, braunen Flecken. Meist sind sie in der Blattrichtung etwas gestreckt und bei einzelnen Getreidesorten fast eckig begrenzt. *Ascochyta* ist in ihrer Morphologie ziemlich großen Veränderungen unterworfen. Besonders die Sporen variieren ziemlich stark in ihren Größenverhältnissen, und manchmal sind sie auch nicht rein hyalin, sondern schwach bräunlich verfärbt. In der Kultur zeigen die einzelnen Stämme wohl Unterschiede im Sporenbildungsvermögen, zeichnen sich aber, soweit bis heute beobachtet werden konnte, durch eine rötliche oder grünliche Verfärbung der jungen Myzelien aus, die im Alter dann durchwegs schwarz werden.

Der Nachweis, daß *Ascochyta sorghi* in den Entwicklungszyklus dieser *Didymella* gehört, wurde auf verschiedenen Wegen geleistet. Ein im Sommer 1949 aus Konidien isolierter Stamm, der in der Folge auf Malzagar (vgl. p. 405) reichlich fruktifizierte, begann auf Filterpapier, das mit einer Nährlösung durchtränkt war (Zusammensetzung: 0,15 % $KH_2PO_4$, 0,05 % $MgSO_4$, 0,1 % Asparagin, 2 % Glukose) neben den reichlich vorhandenen Pyknidien auch einige Hauptfruchtformen mit zweizelligen Ascosporen zu bilden. Auch auf Objektträgern mit einer ganz dünnen Agarschicht (vgl. MÜLLER, 1951) wurden Hauptfruchtformen gebildet. In der Folge isolierten wir mit Hilfe des Mikromanipulators einzelne Ascosporen, und diese neuen Stämme bildeten wiederum sowohl *Ascochyta*-Pyknidien wie auch die *Didymella*-Haupt-

fruchtform. Dabei konnten wir uns überzeugen, daß die Bildung der Hauptfruchtform auch in Einsporkulturen möglich war. Später im Sommer konnten wir neben den *Ascochyta*-Nebenfruchtformen auch im Feld reichlich *Didymella*-Fruchtkörper finden.Auch von diesen isolierten wir Ascosporen und erhielten davon ebenfalls Konidien, so daß der Kreis vollständig geschlossen ist.

Die Auffassungen über die Zugehörigkeit von Haupt- und Nebenfruchtformen sind im Bereich dieser Pilze sehr konfus. Sie treten natürlicherweise gemischt auf, weshalb auch schon alle möglichen Kombinationen vermutet worden sind. Für die exakte Beweisführung — mit Kulturversuchen — ergibt sich aber als Hauptschwierigkeit, daß viele isolierte Stämme gar nicht zur Bildung von Sporen gezwungen werden können und deren Identität später deshalb gar nicht mehr ermittelt werden kann. So sollen nach DURRILL (1919) *Ascochyta graminicola (sorghi)* und *Leptosphaeria tritici* zusammengehören, nach VOGLINO (1904) *Septoria nodorum* und *Sphaerella exitialis.* WEBER (1922) vermutet die Zusammengehörigkeit von *Septoria nodorum* mit einer auf befallenen Pflanzen gefundenen *Leptosphaeria,* die aber keine keimfähigen Ascosporen mehr hatte, so daß er den Beweis für diese Vermutung nicht erbringen konnte.

Laut Diagnose stimmt die aus *Ascochyta*-Kultur hervorgegangene *Didymella* mit *Sphaerella exitialis* Mor. überein, weshalb für diesen Pilz die Kombination *Didymella exitialis* eingeführt werden soll. Der Vergleich mit Typusmaterial von *Didymella autumnalis* Petr. ergibt auch die vollständige Übereinstimmung mit diesem Pilz. *Didymella exitialis* kann folgendermaßen umschrieben werden:

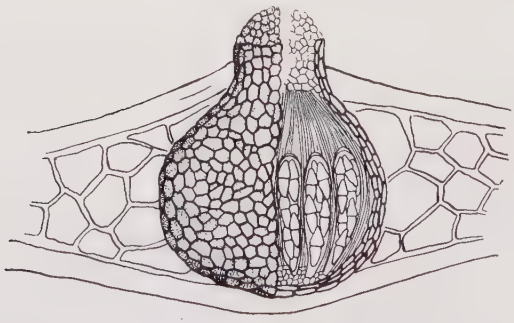


Abb. 3. Schnitt durch einen Fruchtkörper von *Didymella exitialis.* Vergr. 250mal

Die Fruchtkörper wachsen unter der Epidermis oder noch tiefer in das Gewebe eingesenkt, zerstreut oder in größeren Gruppen ziemlich dicht beieinander stehend. Sie sind kugelig oder etwas niedergedrückt und 100 bis 150 $\mu$ groß. Sie brechen mit einer kurz kegelförmigen, manchmal auch fast flachen, von einem rundlichen Porus durchbohrten Mündung hervor. Die Fruchtkörperwand besteht aus regelmäßig vieleckigen, ziemlich dickwandigen Zellen, die in wenigen konzentrischen Lagen angeordnet sind.

Die ziemlich zahlreichen Asci sind zylindrisch oder etwas ausgebuchtet, am Scheitel breit abgerundet, und sitzen mit einem kurzen Stiel in einem aus kleinen, rundlichen, hyalinen und verschleimenden Zellen bestehenden Basalgeflecht. Ihre Membran ist derb- und vor allem am Scheitel ziemlich dickwandig. Sie sind in ein Geflecht von fasrigen Paraphysoiden eingebettet, und sie messen 46—66 $\times$ 8—12 $\mu$. Die acht zweizelligen, hyalinen Sporen liegen zweireihig im Ascus. Sie sind breit spindelig, beidendig ziemlich stark ver-

jüngt und oft schwach gekrümmt. Die Querwand befindet sich meist etwas unterhalb der Mitte, und die obere Zelle ist häufig schwach verbreitert. Sie messen 13—16 × 2,5—4 $\mu$.

Die Pyknidien lassen sich von den Fruchtkörpern der Hauptfruchtform kaum unterscheiden. Die Fruchtkörperwand umschließt einen Hohlraum, in den hinein an kurzen Konidienträgern die ebenfalls zweizelligen Konidien ragen. Diese sind ellipsoidisch, in der Mitte eingeschnürt und septiert. Beidendig sind sie breit abgerundet, hyalin oder im Alter schwach bräunlich und von einem körnigen Plasma erfüllt. Sie messen 12—23 × 3—4 $\mu$.

### 4. *Leptosphaeria nodorum* nov. spec.

Nebenfruchtform: *Septoria nodorum* (Berk.) Berk.

Synonyme: *Depazea nodorum* Berk. — Gard. Chron. Agr. Gaz. 1845, 601, (1845).
*Septoria nodorum* Berk. — in Berkeley et Broome: Ann. mag. nat. hist. 2 ser. **5**, 365—380, (1850).
*Hendersonia nodorum* Petr. — Sydowia **1**, 61, (1947).
*Septoria glumarum* Pass. — Fungi parm. en. — Atti Soc. Crittog. Ital. **2**, 20—47, (1879).
*Phoma Hennebergii* Kühn. — Hedw. 1877, p. 121.
*Macrophoma Hennebergii* Berl. et Vogl. — Atti. Soc. Veneta-Trentina 1886, p. 197.

Einer der wichtigsten Vertreter der Blattdürre verursachenden Erregergruppe ist ohne Zweifel *Septoria nodorum*. Diese Art kommt auf Blättern vor; ihre große Bedeutung sehen wir aber im Auftreten innerhalb der Ähre, wo sie die Spelzen schädigt und oft auch auf die unmittelbar unter der Ähre befindlichen Halmpartien übergreift. Die befallenen Pflanzenpartien werden dunkelbraun verfärbt. Über diesen Pilz sind schon vor 60 Jahren Klagen laut geworden. So meldet Boltshauser (1891) eine starke Beeinträchtigung der Weizenernte im Kanton Thurgau, die durch das starke Auftreten dieses Pilzes verursacht wurde.

Erfolgreiche Infektionsversuche haben folgende Autoren beschrieben: Voglino (1904), Rosen (1921), Weber (1922), Luthra et al. (1937) und Frandsen (1943). Alle stimmen darin überein, daß die Konidien auf sämtlichen oberirdischen Pflanzenteilen Infektionen hervorrufen können. Eigene Versuche mit der oben erwähnten Methode bestätigen dies. Der Pilz bringt das infizierte Gewebe je nach Temperatur nach vier bis sieben Tagen zum Absterben, und je nach dem verwendeten Stamm folgt nach einer gewissen Zeit die Bildung von Konidien. Diese kann aber unter Umständen auch unterbleiben.

Stark befallenes Weizenmaterial wurde nach der Ernte 1951 im Freien aufbewahrt und periodisch auf die darauf vorkommenden Pilze untersucht. Ende Dezember ließ sich eine Art der Gattung *Leptosphaeria* feststellen, die in den schon vorher dunkel verfärbten Halmpartien — allerdings nur spärlich — auftrat. Die Art ließ sich mit keiner der bisher bekanntgewordenen *Leptosphaeria*formen identifizieren, weshalb sie hier als neu beschrieben werden soll:

*Peritheciis subepidermalibus, subglobosis vel depressis, 160—250 μ diam. Ostiolis conicis, perforatis. Pariete perithecii cellulis angulato rotundatis, brunneis, 15—20 μ crassis. Ascis numerosis, cylindraceis, vertice breve stipitatis, 60—70 × 9 μ, 8-sporis. Sporis fusoideis, subhyalinis vel flavis, 3-septatis (cellula secunda crassiore) et in media constrictis, 20—26 × 4 μ.*

*Hab. in calamis emortuis Tritici vulgari L. — Helvetia, Eidg. Landw. Versuchsanstalt, Zürich-Oerlikon, 27. 12. 1951.*

Der Pilz wächst subepidermal in schwarz verfärbten Halmpartien, die er mit lockeren, stromatischen Hyphenkonglomeraten durchwuchert. In diesen entstehen gruppenweise die Fruchtkörper, die die Epidermis zuweilen emporwölben und aufreißen. Die Fruchtkörper sind kugelig oder meist etwas niedergedrückt, am Scheitel entspringt eine kurz kegelförmige, durchbohrte Mündung, und sie besitzen einen Durchmesser von 160—250 μ. Die Fruchtkörperwand ist aus regelmäßig vieleckigen oder auch schwach langgestreckten, in mehr oder weniger konzentrischen Reihen angeordneten, derbwandigen und braunen Zellen aufgebaut. Rings um die Mündung durchziehen hellere oder dunklere Hyphenkonglomerate das Wirtsgewebe, stoßen oftmals bis an die Substratoberfläche durch oder verbinden in lockeren Verbänden die einzelnen Fruchtkörper.

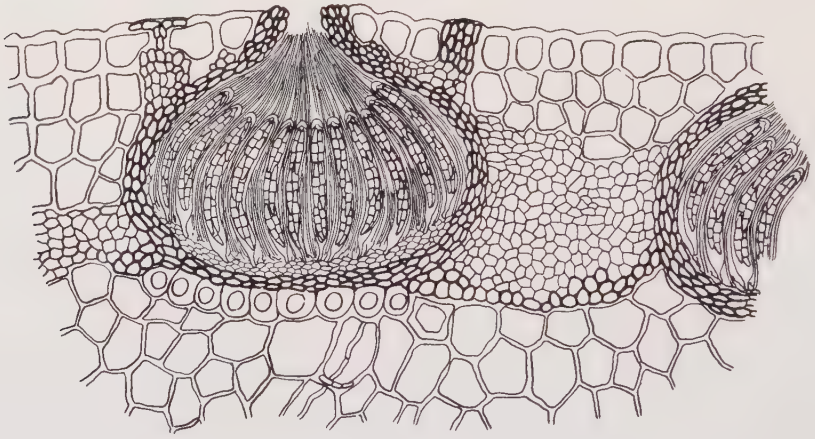


Abb. 4. Schnitt durch ein Stroma von *Leptosphaeria nodorum*. Vergr. 250mal

Die zahlreichen Asci sind zylindrisch, am Grunde in einen schwach verlängerten Stiel ausgezogen, und sie sitzen in einem aus fasrigen Zellen bestehenden Basalgeflecht. Sie messen 60—70 × 9 μ und sind von zahlreichen fädigen Paraphysoiden umgeben. Die acht Ascosporen sind spindelförmig, beidendig ziemlich deutlich zugespitzt und durch drei Quersepten vierzellig. Gegen die zweite Querwand ist die darüberliegende Zelle merklich angeschwollen und von der folgenden durch eine deutliche Einschnürung abgesetzt. Die Sporen sind subhyalin oder schwach gelblich und messen 20—26 × 4 μ.

In der Kultur wächst der Pilz ähnlich wie die fünf Stämme von *Septoria nodorum*, die zum Vergleich zur Verfügung stehen. Ebenso verhielt er sich im Infektionsversuch ähnlich wie diese Pilze; die ersten Schadensymptome zeigten sich in derselben Zeit wie bei gleichzeitig mit *Septoria nodorum* infizierten Pflanzen, und die Intensität wie das Schadbild beider Pilze waren zum Verwechseln ähnlich. Später konnten in den *Leptosphaeria*-Kulturen reichlich Sporen von *Septoria nodorum* nachgewiesen werden; der Entwicklungskreis kann damit als geschlossen gelten.

Schon Davis (1919) hat die Pyknidien von *Septoria nodorum* mit einem Ascomyceten zusammen gefunden, den er als *Sphaerulina* bezeichnete. Weber (1922) hat das Material von Davis überprüft und den betreffenden Pilz mit einem eigenen Fund übereinstimmend gefunden. Er stellte aber den Ascomyceten zu *Leptosphaeria*, ohne ihn zu beschreiben, und es war ihm auch nicht möglich, den Nachweis der Zusammengehörigkeit zu *Septoria nodorum* zu leisten, da die Ascosporen nicht keimten. Immerhin kann aus seinen spärlichen Angaben geschlossen werden, daß sein Pilz dem oben beschriebenen nahe steht.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß der Pilz schon mehrmals gefunden worden ist, bis heute aber als *Leptosphaeria tritici* bestimmt wurde. Er ist aber relativ leicht von *Leptosphaeria tritici* unterscheidbar, und die folgende Zusammenstellung soll die Unterschiede beider Arten festhalten:

| | *Leptosphaeria tritici* | *Leptosphaeria nodorum* |
|---|---|---|
| Fruchtkörper | einzelstehend, kugelig oder schwach niedergedrückt, aus polyedrischen Zellen aufgebaut, 80 bis 130 $\mu$ groß. | oft zu mehreren gruppenweise und durch stromatisches Gewebe miteinander verbunden, niedergedrückt, 160—250 $\mu$ groß. |
| Mündung | undeutlich, verschlossen | deutlich, kegelförmig mit unregelmäßigem Porus. |
| Asci | 45—55 $\times$ 9 $\mu$, am Grunde mit einem kurzen, knotigen Stiel im zelligen Basalgeflecht sitzend. | 60—70 $\times$ 9 $\mu$, am Grunde mit schwach verlängertem Stiel in einem fasrigen Basalgeflecht sitzend. |
| Sporen | vierzellig, zweite Zelle am dicksten, mit undeutlichem Absatz in die dritte Zelle übergehend, braun, mit deutlichem Epispor, beidendig ziemlich stumpf, 16—20 $\times$ 4 $\mu$. 20—26 $\times$ 4 $\mu$. | vierzellig, zweite Zelle besonders im unteren Teil verdickt, zwischen zweiter und dritter Zelle deutliche Einschnürung, subhyalin bis leicht gelblich, an den Enden zugespitzt |

Dieser gefundene Zusammenhang zwischen *Septoria nodorum* und der neuen *Leptosphaeria* hat aber keinen obligatorischen Charakter. Weber (1922) hat gefunden, daß die Konidien des Pilzes ohne weiteres den Winter überstehen können, so daß auch ohne Hauptfruchtform die Weiterexistenz des Pilzes gesichert wäre. Es besteht auch die Möglichkeit, daß ein Teil der vorhandenen Stämme von *Septoria nodorum* überhaupt das Vermögen zur Bildung der Hauptfruchtform verloren hat.

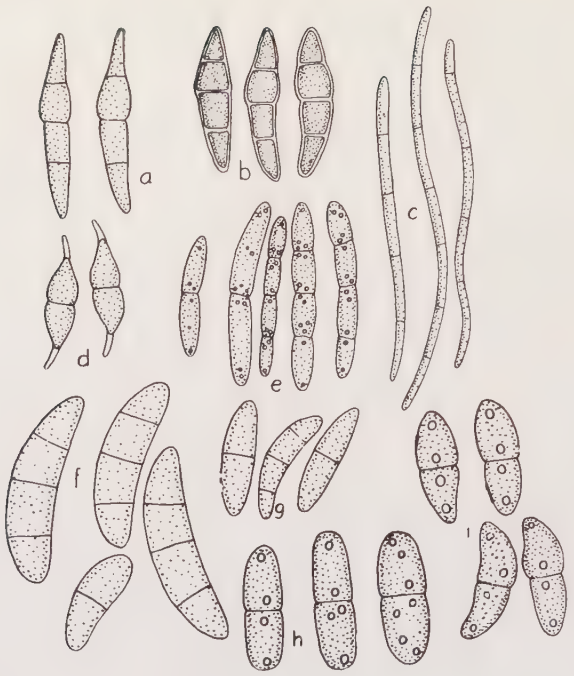



Abb. 5. Sporenformen von

a) *Leptosphaeria nodorum*
b) *Leptosphaeria tritici*
c) *Septoria tritici*
d) *Didymella caudata*
e) *Septoria nodorum*
f) *Fusarium nivale*
g) *Calonectria graminicola*
h) *Ascochyta sorghi*
i) *Didymella exitialis.*

Vergr. 1000mal

### 5. *Leptosphaeria tritici* (Gar.) Pass.

Synonyme: *Pleospora tritici* Gar. — Arch. triennale. Laborat. bot. critt. Pavia **1**, 119, (1874).
*Leptosphaeria tritici* Pass. — M. n. 859.
*Leptosphaeria eustoma* fa. *tritici* Berl. — Icon. fungorum **1**, 56, (1894).

Stellenweise häufig, manchmal aber auch nur spärlich, tritt auf den erkrankten Blättern auch *Leptosphaeria tritici* auf, die von FRANK (1895) als der hauptsächlichste Erreger der Blattdürrekrankheit betrachtet wurde. Früher hatte allerdings JANCZEWSKI (1893, 1894) sich mit diesem Pilz beschäftigt und dabei Infektionsversuche angestellt. Diese waren aber nur auf absterbenden Blattpartien erfolgreich, so daß er dem Pilz keine so wichtige Rolle zuwies. In der Kultur konnte dieser Autor wohl die Bildung der Hauptfruchtform beobachten, hingegen unterblieb die Bildung irgendeiner Konidienform. Die eigenen Versuche mit diesem Pilz bestätigen im wesentlichen die Ergebnisse von JANCZEWSKI. Der Pilz vermochte allerdings auch auf gesunden Blättern Infektionen zu verursachen, doch blieben die daraus resultierenden Blattflecken klein.

*Leptosphaeria tritici* gehört zu einer Gruppe, deren Vertreter auf sehr verschiedenen Wirten vorkommen, sich aber morphologisch sehr ähnlich sind und zum Teil auch als identisch betrachtet werden müssen. BERLESE (1893) führt diese Pilze alle als Varietäten von *Leptosphaeria eustoma* (Fr.) Sacc. an. Ohne kreuzweise Infektionsversuche mit allen Vertretern des Formenkreises kann aber die Frage nicht endgültig abgeklärt werden. Immerhin haben schon WEBER (1922) und JOHNSON (1947) bei auf *Avena* und *Triticum* vorkommenden Formen einen ziemlich engen Wirtskreis gefunden. Beide

unterscheiden sich von *Leptosphaeria tritici* durch die reichliche Bildung von Konidien.

Die von mir früher geäußerte Ansicht, wonach der Pilz *L. eustomoides* heißen solle, ist nicht richtig. *Leptosphaeria tritici* kommt in jedem Fall die Priorität zu. (Vgl. Müller, 1950, Beschreibung des Pilzes ebenfalls dort.)

### 6. *Phoma triticina* nov. spec.

Im Sommer 1951 fand sich — besonders in einem Bestand von *Triticum spelta* — eine Art der Formgattung *Phoma*, welche in der Reinkultur auf Malzagar leicht sporulierte und im Infektionsversuch mittelstarke Schädigungen hervorrief. Leider war es nicht möglich, die Art mit einer schon beschriebenen zu identifizieren. Jedenfalls ist sie von der früher beschriebenen *Phoma raetica* E. Müller (in Zogg, 1951) durch die breiteren und kürzeren Sporen gut verschieden. Der Pilz kann folgendermaßen umschrieben werden:

*Pycnidia subepidermalia, globosa, 50—80 μ diam., apice perforata. Paries pycnidiorum 10 μ crassus, e cellulis plus minusve regulariter angulatis, brunneis, 6—10 μ latis formatus. Conidiophora secundam parietem simplicia, 2—3 μ longa, papilliformia, hyalina. Conidia ellipsoidea, hyalina, saepe in ambolus fuibus cum guttuli oleosis, 5,5—6,5 × 3—3,5 μ.*

*Hab. in foliis emortuis Tritici speltae L. — Helvetia, Eidg. Landw. Versuchsanstalt, Zürich-Oerlikon. 25. 5. 1951.*

Die Pyknidien sitzen subepidermal und sind kugelig oder schwach niedergedrückt, am Scheitel von einem rundlichen Porus durchbohrt, und sie messen 50 bis 80 μ im Durchmesser. Die Wände sind aus regelmäßig vieleckigen braunen, ziemlich derbwandigen Zellen aufgebaut und etwa 10—15 μ dick. Der ganzen inneren Fruchtkörperwand entlang sitzen die kurzen, 2—3 μ langen, fädigen, einfachen, hyalinen Konidienträger, an deren Enden je eine ellipsoidische, hyaline Spore sitzt. Diese messen 5,5—6,5 × 3 bis 3,5 μ und enthalten an jedem der Enden einen Öltropfen.

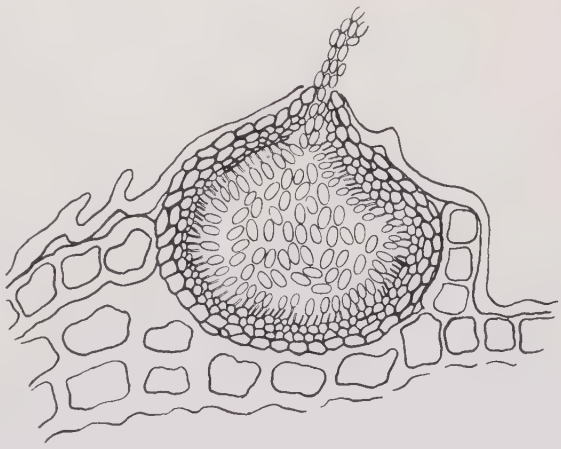


Abb. 6. Schnitt durch einen Fruchtkörper von *Phoma triticina*. Vergr. 500mal

### 7. *Septoria tritici* Rob.

(in Desmazière. Ann. d. Sci. Nat. Bot. Ser. 2, 17, 91 (1842)

Der bekannteste Erreger von Blattdürreerscheinungen ist zweifellos *Septoria tritici*. Sie zeichnet sich durch langfädige, hyaline Sporen aus, welche sich während des ganzen Jahres auf den infizierten Pflanzen entwickeln

können. Der Pilz ruft ähnlich wie *Ascochyta* bei bestimmten Weizensorten scharf begrenzte, in der Richtung der Gefäßbündel gestreckte Flecken hervor; bei anderen sind die Blattflecken weit ausgebreitet, und im Zentrum bilden sich die als schwarze Punkte sichtbaren Pyknidien. Trotzdem der Pilz auf verschiedenste Arten kultiviert wurde, war es bisher nicht möglich, die Bedingungen, die ihn zur Bildung einer Sexualform veranlassen würden, zu ermitteln. Aus Analogieschlüssen liegt die Vermutung nahe, daß die Hauptfruchtform des Pilzes eine Art aus der Gattung *Mycosphaerella* sein müsse, sofern sie überhaupt gebildet wird.

Die eigenen bisherigen Infektionsversuche bestätigen die Ergebnisse früherer Autoren und sollen deshalb nicht weiter ausgeführt werden (vgl. KRÜGER, 1895; MANGIN, 1899; WEBER, 1922; FRANDSEN, 1943).

## Zusammenfassung

Der Begriff „Getreideblattdürre" umfaßt die durch pathogene Ascomyceten und Fungi imperfecti (mit Ausnahme des Mehltaus) hervorgerufenen Absterbe-Erscheinungen an den grünen Teilen der Getreidepflanzen. Einige bis heute in der Schweiz gefundenen Erreger werden auf ihre parasitische Eignung mit Hilfe einer Labortestmethode geprüft und ihre systematische Stellung in der Folge besprochen. Besonders wurde versucht, Beziehungen zwischen den vorkommenden Ascomyceten und Imperfekten aufzudecken, und es gelang auch, in zwei Fällen die Zugehörigkeit eines Imperfekten in den Entwicklungszyklus eines Ascomyceten abzuklären. Folgende Pilze werden angeführt:

1. *Calonectria graminicola* (B. et Br.) Wr.
   Nebenfruchtform: *Fusarium nivale* (Fr.) Ces.
2. *Didymella caudata* nov. spec.
3. *Didymella exitialis* (Mor.) comb. nov.
   Nebenfruchtform: *Ascochyta sorghi* Sacc.
4. *Leptosphaeria nodorum* nov. spec.
   Nebenfruchtform: *Septoria nodorum* (Berk.) Berk.
5. *Leptosphaeria tritici* (Gar.) Pass.
6. *Phoma triticina* nov. spec.
7. *Septoria tritici* Rob.

## Summary

In several regions of Switzerland leaf blotch fungi on cereals, especially on wheat may cause rather severe diseases. Some specimen of Ascomycetes and Fungi imperfecti occurring on wheat have been isolated. Their pathogenicity has been tested by a method which is described. In the present in-

vestigation attempts have been made to find connections between the occurring Ascomycetes and Fungi imperfecti and two of such connections could be detected. The taxonomy of the following fungi is discussed:

1. *Calonectria graminicola* (B. et Br.) Wr.
   Conidial stage: *Fusarium nivale* (Fr.) Ces.
2. *Didymella caudata* nov. spec.
3. *Didymella exitialis* (Mor.) comb. nov.
   Conidial stage: *Ascochyta sorghi* Sacc.
4. *Leptosphaeria nodorum* nov. spec.
   Conidial stage: *Septoria nodorum* (Berk.) Berk.
5. *Leptosphaeria tritici* (Gar.) Pass.
6. *Phoma triticina* nov. spec.
7. *Septoria tritici* Rob.

## Literaturverzeichnis


Anliker, J., 1935. Beiträge zur Kenntnis der Fusariose des Roggens. — Beiträge zur Kryptogamenflora der Schweiz, **8**.

von Arx, A., 1949. Beiträge zur Kenntnis der Gattung *Mycosphaerella*. — Sydowia, **3**.

Berlese, A. N., 1893. Icones fungorum ad usum Sylloges Saccardianae accomodatae, **1**. Verlag Friedländer, Berlin.

Boltshauser, H., 1891. Eine Krankheit des Weizens. — Mitth. der Thurgauischen Naturf. Ges. **9**, 1—3.

Davis, J. J., 1919. Notes on parasitic fungi in Wisconsin IV. — VI. — Trans. Wisconsin Acad. Sci. **19**, 671—689, 690—704, 705—727.

Desmazière, J. B. H. J., 1842. Neuvième notice sur quelques plantes cryptogames. — Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 2, **17**, 91.

Durrill, L. W., 1919. The imperfect stage of *Leptosphaeria tritici* of wheat. — Science n. ser. **50**, 252—253.

Frandsen, N. O., 1943. *Septoria*-Arten des Getreides und anderer Gräser in Dänemark. — Meddeldser fra Plantepatologisk Afdeling den Kgl. Veterinaer- og Landbohjskole, Kobenhavn, **26**.

Frank, B., 1895. Die neuen deutschen Getreidepilze. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. **13**, 61—65.

— —, 1896. Die Krankheiten der Pflanzen II. Die durch pflanzliche Feinde hervorgerufenen Krankheiten. — 2. Aufl., Breslau.

Garovaglio, S., 1874. Relazione sulla causa dell'allemento d'alcuni saggi di frumento. — Arch. triennale del Laborat. di bot. crittog. da Pavia **1**, p. 119.

Janczewski, E., 1893. Les périthéces du *Cladosporium herbarum*. — Bul. Inter. Acad. Sci. Cracowice 1893.

— —., Recherches sur le *Cladosporium herbarum* et ses compagnons habituel sur les céréales. ibid. 1894.

Krüger, F., 1895. Beiträge zur Kenntnis von *Septoria graminum* Desm. — Ber. Deutsch. Bot. Ges. **13**, p. 137—139.

Kühn, J., 1877. *Phoma Hennebergi* nov. spec. — Hedwigia, 1877, p. 121—122.

Luthra, J. C., Saltar, A. und Ghani, M. A., 1937. A comparative study of species of *Septoria* occuring on wheat. — Indian Journal Agr. Sci. 7.

— —, — — und — —, 1938. Perpetuation and control of *Septoria* disease of wheat in the Punjab. — Agriculture Live-Stock India, 8.

Mangin, L., 1899. Contribution à l'étude de quelques parasites du blé. — Overs. Kgl. Danske Vidensk. Selsk. Forh. 1899, No. 4.

Morini, F., 1886. Alcune osservazione sopra una nuova malattia del frumento. — Nuov. giorn. Bot. Ital. 18.

Müller, E., 1950. Die schweizerischen Arten der Gattung *Leptosphaeria* und ihrer Verwandten. — Sydowia 4.

— —, 1951. Über die Entwicklung von *Pleospora Gaeumanni* nov. spec. — Ber. schw. bot. Ges. 61, 168.

Passerini, G., 1878. — in Rabenh. Fungi eur. Cent. 8.

Petrak, F., 1925. Mykologische Notizen VIII. Über *Didymella autumnalis*. — Ann. myc. 23, p. 111.

— —, 1947. Kritische Bemerkungen über einige in letzter Zeit als neu beschriebene Askomyzeten und Fungi imperfecti. — Sydowia 1, p. 61—79.

Rosen, H. R., 1921. *Septoria* glume blotch of wheat. — Arkansas Exp. Stat. Bull. 175, 3—17.

Schaffnit, E., 1912. Der Schneeschimmel und die übrigen durch *Fusarium nivale* Ces. hervorgerufenen Krankheitserscheinungen des Getreides. — Landwirtschaftliche Jahrbücher 43, 521—638.

— —, 1920. Über die geographische Verbreitung von *Calonectria graminicola* etc. — Landw. Jahrbücher 54, 521 ff.

Sprague, R., 1950. Diseases of Cereals and Grasses in North America. — New York, The Ronald Press Company.

— —, 1944. *Septoria* Disease of Gramineae in Western United States. — Oregon State College; Cornvallis, Oregon. College Press.

— — and Johnson, A. G., 1950. *Ascochyta* leaf spots of Cereals and grasses in the United States. — Mycologia 42, 523.

Voglino, P., 1904. Intorno allo sviluppo e parasitismo delle *Septoria graminum* Desm. e *glumarum* Pass. — Ann. R. Acad. Agr. Torino 46.

Weber, G. G., 1922. II. *Septoria* Diseases of wheat. — Phytopath. 12, 537 ff.

Wollenweber, H. W., 1913. Studies on the *Fusarium* problem. — Phytopathology 3, 24—50.

— — und Reinking, O. A., 1935. Die Fusarien. Berlin (Paul Parey).

Zogg, H., 1950. in Koblet R. Bericht über die Tätigkeit der Eidg. Landw. Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon pro 1949/50 im Landwirtsch. Jahrbuch der Schweiz 64, p. 432.

— —, 1951. in Koblet R. Bericht über die Tätigkeit der Eidg. Landw. Versuchsanstalt Zürich-Oerlikon pro 1951 im Landwirtsch. Jahrbuch der Schweiz 65, p. 512.

— —, 1951. Studien über die Pathogenität von Erregergemischen bei Getreidefußkrankheiten. — Phytop. Ztschr. 18, 1—54.

*Eidgenössische Versuchsanstalt für Obst-, Wein- und Gartenbau, Wädenswil*
*Direktor: Prof. Dr. F. Kobel*

# Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von *Poinsettia pulcherrima* Willd.

Von
S. Blumer

*Mit 4 Abbildungen*

Der aus Mexiko und Zentralamerika stammende Weihnachtsstern *(Poinsettia pulcherrima* Willd.) wird bei uns nicht von vielen Krankheiten bedroht. Die von Dodge und Rickett (2) erwähnten Fußkrankheiten, die durch *Pythium, Rhizoctonia* und *Fusarium* verursacht werden, sowie die Bakteriosen sind uns aus der Schweiz noch nicht bekannt. Gelegentlich findet man an einzelnen Pflanzen die von Pape (4) als Viruskrankheit bezeichneten Blattdeformationen, doch scheint ihre wirtschaftliche Bedeutung gering zu sein. Bedeutend größere Ausfälle entstehen, wenn sich Schimmelpilze auf den Blütenständen ansiedeln. Diese Pilze können unter bestimmten Bedingungen so stark überhand nehmen, daß ein großer Teil der Pflanzen entwertet wird. Wir hatten in den Jahren 1950 bis 1952 Gelegenheit, mit zwei pathogenen Schimmelpilzen einige Versuche durchzuführen. Meinem Mitarbeiter A. Harder möchte ich für die Durchführung der Versuche den besten Dank aussprechen, ebenso Herrn Isler für die Herstellung der Abbildungen.

## *Botrytis cinera* Pers.

Die Graufäule auf den Blütenständen von *Poinsettia* wurde schon 1910 von Spaulding (6) beschrieben. Da dieser omnivore Parasit sozusagen in jedem Gewächshaus heimisch ist, erscheint es nicht verwunderlich, daß er auch auf *Poinsettia* übergeht. Es werden immer zuerst die zentralen Cyathien befallen, die bekanntlich auch zuerst aufblühen. Ihre Stielchen verfärben sich braunschwarz und schrumpfen ein. Die infizierten Cyathien fallen meistens ab, bevor der Pilz fruktifiziert. Erst am Boden entwickeln sich die mausgrauen Rasen der *Botrytis.* Die Krankheit breitet sich immer vom Zentrum des Blütenstandes nach der Peripherie aus (Abb. 1). Zuletzt werden auch die farbigen Hochblätter befallen, womit das Zerstörungswerk beendet ist.

Für unsere Versuche verwendeten wir einen *Botrytis*-Stamm, der 1944 von Trauben isoliert wurde. Trotz der mehrjährigen Kultur auf Agar bildet er immer noch reichlich Konidien, und seine Aggressivität gegenüber Trauben und auch *Poinsettia* blieb unverändert hoch. Wir dürfen wohl annehmen, daß jeder *Botrytis*-Stamm, der in Gewächshäusern auf organischen Resten vorkommt, ohne weiteres auf *Poinsettia* übergehen kann.

Zunächst versuchten wir festzustellen, ob durch mechanische Verletzung junger Cyathien eine Infektion ermöglicht wird. Die aufblühenden Cyathien

Abb. 1. Befall durch *Botrytis*, spätes Stadium. In der Mitte die Narben der abgefallenen Cyathien, an der Peripherie noch einige gesunde Teilblütenstände

wurden nach der Entwicklung der Blütenorgane, hauptsächlich nach der Farbe der Nektarien, in vier Klassen eingeteilt. Sie wurden zum Teil mit einer Nadel leicht verletzt, zum Teil unverletzt mit einer Konidiensuspension beimpft. Es zeigte sich, daß die Infektion nur im Stadium der Vollblüte gelingt. In den jungen Cyathien wurde die Einstichstelle sofort durch den austretenden Milchsaft ausgefüllt. Es ist möglich, daß aus diesem Grunde keine Infektion zustande kam. Im Stadium der Vollblüte dagegen gelang jede Infektion auch ohne vorherige Verletzung. Der Befall durch *Botrytis* wird also in erster Linie durch das Entwicklungsstadium der Cyathien bedingt.

Bei niedrigen Temperaturen kann die Entwicklung der Blüten wesentlich verzögert werden. Wir untersuchten nun, in welcher Weise der Befall durch die Temperatur bedingt wird. Je 18 Pflanzen wurden in zwei benachbarten Kabinen unseres Gewächshauses gehalten, und zwar eine Serie bei 20°, die andere bei 14° C. Allerdings mußten tägliche Abweichungen von ± 2 bis 3° in Kauf genommen werden. Die Pflanzen wurden am 23. November 1951 mit einer Konidiensuspension besprüht. Die ersten Infektionen zeigten sich nach zehn Tagen.

Die Ergebnisse dieses Versuches sind aus Abb. 2 ersichtlich. Als 100% wird hier die Gesamtzahl der Cyathien bezeichnet, die innerhalb der Versuchszeit, d. h. bis zum 28. Januar (62 Tage) zur Vollblüte gelangten. Bei 20° C waren es 336 Cyathien, bei der niedrigen Temperatur 293. Bei 20° waren nach einem Monat alle Cyathien in Vollblüte oder schon verblüht, während bei 14° diese Entwicklung erst gegen Mitte Januar, also nach 50 Tagen abgeschlossen war. Der Befall durch *Botrytis* geht der Kurve des Aufblühens genau parallel. Durch die Herabsetzung der Temperatur wurde der Befall durch *Botrytis* in gleichem Ausmaße verzögert wie die Entwicklung der Blüte.

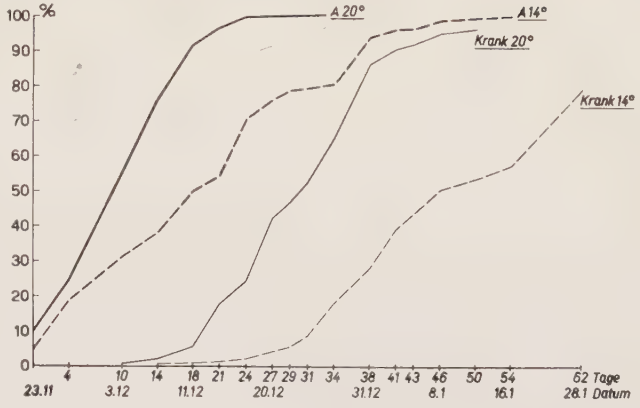



Abb. 2. Aufblühen von *Poinsettia* (Kurve A) und Befall durch *Botrytis* bei 20° und 14°

Vergleicht man in Abbildung 2 nur die beiden Kurven der kranken Cyathien, so könnte man zum Eindruck kommen, daß der Befall durch *Botrytis* stark reduziert werden kann, wenn die Poinsettien bei tieferen Temperaturen gehalten werden. Setzt man aber den Prozentsatz der zu einem bestimmten Zeitpunkt festgestellten kranken Cyathien mit der Kurve des Aufblühens bei der gleichen Temperatur in Beziehung, so kommt man zu einem anderen Ergebnis. Wenn bei 20° C rund 75 % der Cyathien aufgeblüht sind, beträgt der Prozentsatz der kranken Blüten 2,4 %. Bei 14° dagegen finden wir 5 % kranke Blüten, wenn das Aufblühen gleich weit fortgeschritten ist. Noch deutlicher erscheint dieser Unterschied, wenn 95 % der Cyathien aufgeblüht sind. Zu diesem Zeitpunkt haben wir bei 20° C einen Befall von 17,5 %, bei 14° dagegen 35 %. Auf die Zahl der aufgeblühten Cyathien bezogen trat also *Botrytis* bei der tieferen Temperatur doppelt so stark auf als bei der höheren. Es kann deshalb der Praxis empfohlen werden, die Temperatur vor dem Aufblühen möglichst hoch zu halten (18 bis 20°) und zugleich für gute Ventilation zu sorgen (Dodge und Rickett, 2). Es wird damit auch ein schnelles und gleichmäßiges Aufblühen erreicht. Später sollten die Pflanzen jedoch wieder kühler gehalten werden, um die Blütezeit möglichst zu verlängern. Es scheint uns, daß sich bei zweckmäßiger und sauberer Kultur die *Botrytis* praktisch genügend bekämpfen läßt, ohne daß man zu Spritzungen mit Kupfermitteln greifen muß.

Der Befall durch *Botrytis* bei *Poinsettia* ist also in erster Linie durch den Entwicklungszustand der Blüte bedingt und nicht durch direkte Einwirkung der Temperatur auf den Pilz. Der von uns verwendete *Botrytis*-Stamm hat sein Wachstum-Optimum bei 25 bis 27° C. Bei 14° wächst er nicht wesentlich schwächer als bei 20°. Die Tatsache, daß er bei tieferen Temperaturen relativ stärker pathogen ist, spricht auch nicht dafür, daß die Pathogenität in diesem Falle in erster Linie auf seine enzymatische Wirksamkeit zurückgeführt werden kann, da diese bei höheren Temperaturen stärker sein müßte. Dagegen haben Gäumann und Nef (3) gezeigt, daß *Botrytis cinerea* bei Temperaturen, die bedeutend unter dem Optimum für das Wachstum liegen, größere Mengen von Pektase bildet als bei höheren Temperaturen. Es ist möglich, daß dieser Faktor für die relativ stärkere Pathogenität des Pilzes bei tieferen Temperaturen von Bedeutung ist. Da aber bei beiden angewendeten Temperaturen der Befall erst im Stadium der Vollblüte ein-

setzte, kommen wir hier ohne die Annahme einer durch das Alter der Blütenorgane bedingten Resistenzverminderung nicht aus.

### *Penicillium stoloniferum* Thom.

Im Dezember 1948 erhielten wir von drei verschiedenen Betrieben aus Zürich und Basel *Poinsettien,* die stark von einem *Penicillium* befallen waren. Nach Bestimmung durch das Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn handelte es sich um *Penicillium griseo-brunneum* Dierckx, eine Art, die von RAPER und THOM (5) neuerdings zu *Penicillium stoloniferum* Thom gestellt wird. Seither sind uns aus der Schweiz keine weiteren Mitteilungen über das Auftreten von *Penicillium* an *Poinsettia* zugekommen. Dagegen berichtet VALENTA (7) über das Vorkommen von *Penicillium brevi-compactum* Dierckx auf den Blütenständen von *Poinsettia* in der Tschechoslowakei. Diese Art gehört wie *Penicillium stoloniferum* Thom in die *Brevi-Compactum*-Gruppe. *Penicillium brevi-compactum* hat etwas dickere Konidienträger, Äste und Metulae als *Penicillium stoloniferum,* doch sind die Unterschiede gering, und es erscheint durchaus möglich, daß es sich in der Schweiz und in der Tschechoslowakei um die gleiche Art handelte.

Das Krankheitsbild ist ähnlich wie beim Befall durch *Botrytis* (BLUMER, 1). Auch *Penicillium* befällt zuerst die zentralen Cyathien des Blütenstandes und breitet sich dann gegen die Peripherie aus. Auch hier scheint das Entwicklungsstadium der Cyathien für den Befall ausschlaggebend zu sein. Im Gegensatz zu *Botrytis* verursacht *Penicillium* nicht eine Bräunung und Schrumpfung der Stielchen. Diese werden gelb, und die Cyathien fallen schon bei leichter Berührung ab. Nicht selten treten an der Stielbasis vor dem Abfallen Tropfen von Milchsaft aus (Abb. 3). Der Pilz fruktifiziert schon an den festsitzenden Cyathien reichlich, so daß befallene Pflanzen vollständig entwertet werden.

Abb. 3. Teilansicht eines von *Penicillium stoloniferum* befallenen Blütenstandes. Austritt von Milchsaft an der Stielbasis

*Penicillium stoloniferum* ist eine weit verbreitete Art, und

Valenta vermutet, daß die Nektarien von *Poinsettia* ein ideales Substrat für Schimmelpilze darstellen. Bei den mit *Botrytis* infizierten Pflanzen wurden bei beiden Temperaturen je 30 Ausstriche von Nektar auf Bierwürzeagar durchgeführt, um den Gehalt des Nektars an keimfähigen Konidien festzustellen. Es ergab sich folgendes:

| | 14 ° C | 20 ° C |
|---|---|---|
| Ohne Pilze | 7 | 14 |
| *Botrytis* | 10 | 6 |
| *Penicillium* | 2 | 5 |
| Hefen, *Torula* und andere Pilze | 7 | 2 |
| *Cladosporium* | 4 | 3 |

Da es sich um künstlich mit *Botrytis* infizierte Pflanzen handelt, ist eigentlich die Ausbeute von *Botrytis* aus dem Nektar als gering zu bezeichnen. Möglicherweise ertragen diese Konidien die relativ hohen Zuckerkonzentrationen nicht. Auffällig ist ferner, daß der Nektar bei 20° C weniger keimfähige Sporen enthält als bei 14 °.

Wir suchten den Grund zunächst in einer verschiedenen Zuckerkonzentration. Nach den Zuckerbestimmungen, die Dr. H. Gerber für uns durchführte, ergaben sich folgende Werte:

| | 14 ° C | 20 ° C |
|---|---|---|
| Gesamt-Zucker (nach Inversion) berechnet als Glukose | 36,8 % | 30,4 % |
| Monosaccharide, berechnet als Glukose | 11,8 % | 12,2 % |

Die Unterschiede in der Zuckerkonzentration sind nicht so bedeutend, daß damit die immerhin beträchtlichen Unterschiede im Gehalt an keimfähigen Konidien erklärt werden könnten.

Der Krankheitsverlauf ist bei *Penicillium*-Infektionen ungefähr gleich wie bei *Botrytis*. Auch hier werden die Cyathien nur im Stadium der Vollblüte befallen. Junge Cyathien können auch nach Verletzung nicht infiziert werden. Im Winter 1950/51 wurde ein Infektionsversuch mit beiden Pilzen, getrennt und als Mischinfektion durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Abbildung 4 ersichtlich. Es zeigt sich, daß beide Pilze ungefähr im gleichen Maße pathogen sind. Beide führten bei einer Temperatur von 18 bis 20 ° C nach 40 bis 50 Tagen zur völligen Vernichtung der Blütenstände.

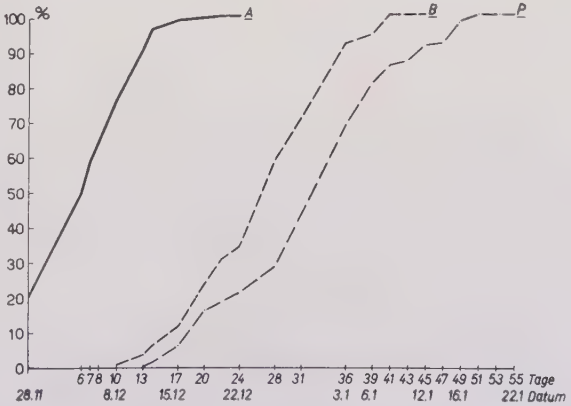



Abb. 4. Aufblühen von *Poinsettia* (Kurve A) und Krankheitsverlauf bei Befall durch *Botrytis* (B) und *Penicillium* (P) bei 18 °

In Agarkulturen glaubten wir zuerst eine deutliche antagonistische Wirkung zwischen *Botrytis* und *Penicillium stoloniferum (P. griseobrunneum)* feststellen zu können. Bei Mischinfektionen mit beiden Pilzen konnten

wir aus kranken Cyathien bald *Botrytis*, bald *Penicillium* isolieren, und in vielen Fällen kamen auch beide Pilze nebeneinander vor, ohne daß sich diese Doppelinfektion in den Symptomen oder im Krankheitsverlauf irgendwie geäußert hätte. Es sei hier beigefügt, daß Valenta (7) keine antagonistische Wirkung von *Penicillium brevi-compactum* gegenüber *Botrytis cinerea* beobachtete. Dagegen bildete *Penicillium* in seinen Versuchen in Czapek-Nährlösung eine Welke erzeugende, toxische Substanz.

*Penicillium stoloniferum* scheint in Gewächshäusern ziemlich verbreitet zu sein. Mein Mitarbeiter J. Kundert isolierte aus dem Nektar von *Poinsettia* sowie von abgefallenen Cyathien 20 *Penicillium*-Stämme aus dem Versuch 1951/52 mit *Botrytis*. Davon gehörten zehn Stämme zu *Penicillium stoloniferum*. Trotzdem trat diese Art in diesem Versuch nie pathogen auf. Es ist deshalb anzunehmen, daß nur einzelne Stämme von *Penicillium stoloniferum* zu einer parasitischen Lebensweise befähigt sind.

## Zusammenfassung

Das Auftreten der durch *Botrytis cinerea* und *Penicillium stoloniferum* verursachten Blütenfäulen an *Poinsettia* ist in erster Linie vom Grad der Entwicklung der Cyathien abhängig. Der Befall erfolgt erst bei Vollblüte.

Bei niedrigen Temperaturen (14° C) wird sowohl das Aufblühen als auch das Fortschreiten der Krankheit verzögert, aber im Vergleich zur Zahl der zu einem bestimmten Zeitpunkt aufgeblühten Cyathien ist der Befall durch Botrytis bei 14° C bedeutend stärker als bei 20°.

## Summary

The inflorescences of *Poinsettia* may be attacked by the Gray Mold, *Botrytis cinerea* and by *Penicillium stoloniferum* Thom. The symptoms of the two diseases are described. Both fungi infect the cyathia only in the stage of full-bloom.

At low temperatures (14° C) the plants come later into bloom and both diseases develop more slowly, but in relation to the number of cyathia being in full bloom the attack of Gray Mold is much heavier at 14° C than at 20°.

## Literaturverzeichnis

1. Blumer, S., Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von Poinsettia. Schweizer Garten **20**, 371—373, 1950.
2. Dodge, B. O. and Rickett, H. W., Diseases and Pests of Ornamental Plants. New York 1952.
3. Gäumann, E. und Nef, U., Der Einfluß der Temperatur auf die enzymatische Leistungsfähigkeit zweier pflanzenpathogener Pilze. Ber. Schweiz. Bot. Gesellsch. **57**, 258—271, 1947.
4. Pape, H., Die Praxis der Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen der Zierpflanzen. 3. Aufl. Berlin 1939.
5. Raper, K. B. and Thom, Ch., Manual of the Penicillia. Baltimore 1949.
6. Spaulding, P., Botrytis as a Parasite upon Chrysanthemum and Poinsettias. Missouri Bot. Gard. Ann. Reports 1910, 185—188.
7. Valenta, Vlk., Nový rastlinný parazit — Penicillium brevi-compactum —. Sborník československé akademie zemedělské **24** (3—4), 281—288, 1951.

*Istituto de Patologia Vegetale e Microbiologa Agraria dell'Università di Pisa*
*Direttore: O. Verona*

# Una ricerca sull'azione della citrinina prodotta da *Penicillium citrinum* Thom su funghi fitopatogeni

per

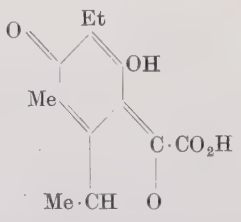
O. Verona e P. Gambogi

*7 Fig.*

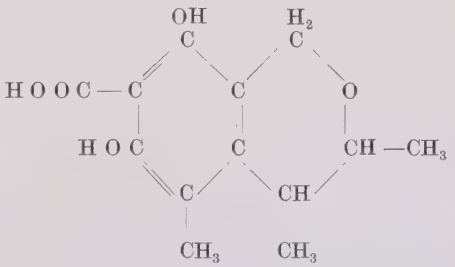
La ricerca è stata motivata da un casuale inquinamento di una coltura in piastra di *Sclerotium Rolfsii* Sacc. Osservato che il fungo inquinante manifestava azione antagonista verso lo Sclerotium abbiamo pensato che avrebbe avuto interesse precisare la natura di tale antagonismo. D'altronde oggi siamo meglio preparati verso tale ordine di ricerche e non possiamo più limitarci ad una segnalazione generica del fatto antagonistico. tagonistico.

Il fungo inquinante, a parte isolato, fu diagnosticato come *Pen. citrinum* Thom.

Nei riguardi di questo Penicillo già Thom, nella sua Monografia "Cultural Studies of species of Penicillium", aveva notato che "*P. citrinum* produces a lemon yellow colour, soluble in alcohol, in media containing sugars, milk, gelatin, bread and potato". Tale pigmento, peraltro, fu isolato e studiato solo più tardi da Hetherington e Raistrick (1931) (6). Chiamato «citrinina» fu visto che, chimicamente, appartiene alla serie dei composti chinonici. Ad esso da Coyne, Raistrick e Robinson (1931) (4), fu attribuita la seguente formula strutturale*):




*) Più recentemente (cfr. H. Vogel: Die Antibiotica, Nürnberg 1951 e, quindi, T. S. Gore e Mitarb., Amer. Soc. 70, 2287, 1948; A. H. Frye e Mitarb., Journ. Org. Chem., 14, 397, 1949; N. J. Cartwright, A. Roberston e W. B. Whalley, Nature, 163, 94, 1949) alla citrinina è stata attribuita la formula:



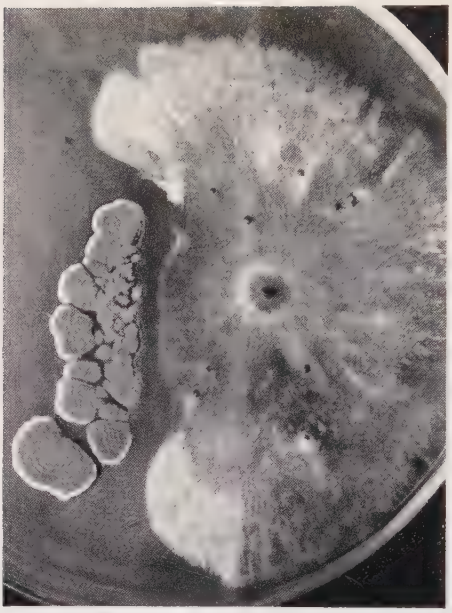


Fig. 1. L'osservato antagonismo tra *Sclerotium Rolfsii* Sacc. e *Pen. citrinum* Thom

Citrinina, oltre che da *Pen. citrinum*, è prodotta da *Asp. terreus* Thom, *Pen. lividum* Westl., *Pen. phaeo-janthinellum* Biourge, *Pen. implivatum* Biourge, *Pen. citreo-sulfuratum* W., *Pen. chrzaszczi* Zaleski, *Asp. candidus* Link nonchè da *Crotalaria crispata* (11), (5). Non tutti i ceppi, peraltro, presentano uguale attività citrininogenetica.

La citrinina è di facile preparazione precipitando dalla soluzione metabolica in presenza di acido cloridrico. In prima precipitazione, già sufficientemente pura, si presenta sotto forma di polvere caratteristicamente colorata in giallo-limone e costitutita di microcristalli gialli, stretti, appiattiti, come laminette allungate, ad estremità appuntite, a bordi dentati e di norma riuniti a due od anche a tre o più. In forma purissima si ottiene sciogliendola in alcool etilico bollente ove è solubile, ma dal quale riprecipita con il tempo sotto forma di aghi prismatici più o meno lunghi e sempre di un bel colore giallo.

Fig. 2. Citrinina in forma microcristallina e cristallina

In acqua è praticamente insolubile; è solubile, invece, in una soluzione acquosa di idrato sodico o di carbonato sodico e, inoltre, in alcool etilico e

n-butilico, cloroformio e acetone. Si decompone a 166—170° C. Otticamente è levogira.

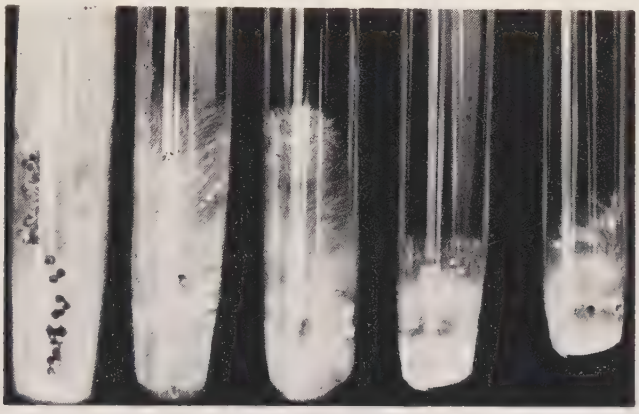


Fig. 3. Sviluppo di *Sclerotium Rolfsii* in agar contenente quantità crescenti di liquido metabolico di *Pen. citrinum*. A sinistra controllo; quindi si noti la crescente limitazione di sviluppo e la mancata maturazione degli sclerozi

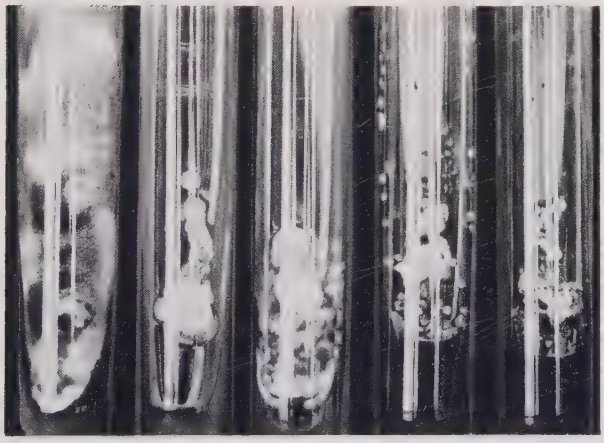


Fig. 4. Sviluppo di *Endothia parasitica* su agar contenente quantità crescenti di liquido metabolico di *Pen. citrinum*. A sinistra controllo

L'azione antibiotica della citrinina fu la prima volta saggiata da Raistrick e Smith (1941) (9); quindi fu ancora sperimentata da Oxford (1942) (8), da Bailey e Cavallito (1943) (2) e Timonin e Rouatt (1944)

(10). In breve, è stato visto che la citrinina ha potere antibiotico nelle dosi pari a 50 000 U. verso i germi grampositivi *(Bac. subtilis* e *Staph. aureus)*, non verso i germi gramnegativi. La sua azione, a quanto sembra, si porta sugli enzimi respiratori (MICHAELIS e THATCHER, 1945 [7]). Peraltro è relativamente tossica ; in topi, la massima tolleranza, per via orale e per via intraperitoneale si aggira sulle 100 U. (AMBROSE e DE EDS, 1945 [1]).

Nell'idea, come si è detto, di chiarire l'azione antagonistica di *Pen. citrinum* sono state eseguite a titolo orientativo, già prima di procedere all'estrazione e purificazione della citrinina, alcune prove utilizzando, per queste, i liquidi greggi peraltro un poco concentrati. Confermata l'azione antibiotica (tecnica del pozzetto) verso i germi grampositivi *(Bac. subtilis* e *Staph. aureus)* furono allestite colture in agar-fagiuoli saccarosato contenenti quantità seriate di liquido e quindi seminate con alcuni funghi fitopatogeni.

Fu osservato che molti, dei funghi sperimentati, non risultano influenzati nel loro sviluppo dalla presenza di quantità, anche considerevoli, di liquido colturale. Altri, invece, svilupparono lentamente e limitatamente: tra questi *Sclerotium Rolfsii*, come si aveva ragione di pensare, e *Endothia parasitica*. L'azione degli stessi liquidi, su *End. parasitica*, fu anche provata seminando il fungo in corrispondenza di piccola incisione su rametti di castagno sterilizzati e quindi lasciati per 20′ in bagno nel liquido colturale avendo a controllo rametti immersi per ugual tempo in acqua sterile. Anche in questa prova, mentre si ottenne buon sviluppo del fungo nei rametti di controllo, molto scarso sviluppo fu ottenuto in quelli sottoposti all'azione del liquido colturale.

Era interessante, communque, saggiare l'azione del composto puro che nel fratempo avevamo avuto cura di preparare in sufficiente quantità. Esso fu aggiunto ad agar-fagiuoli in dosi diverse e crescenti comprese tra $\mu$g 100 per ml. e $\mu$g 1000 per ml. I vari tubi, previa sterilizzazione, furono seminati con una piccola serie di funghi fitopatogeni e incubati a 26 $^0$ C. per un numero considerevole di giorni.

I risultati ottenuti furono:

Fig. 5. Rametti di castagno inoculati con *Endothia parasitica*. A destra controllo; a sinistra rametto tenuto in contatto per 20′ con liquido colturale di *Pen. citrinum*

| | Controllo | citrinina: μg/ml. 100 | 250 | 500 | 1000 |
|---|---|---|---|---|---|
| *Alternaria solani* (E. et M.) J. et Gr. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + | + + |
| *Botrytis cinerea,* Pers. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + |
| *Colletotrichum Lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Bri. et Cav. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + |
| *Endothia parasitica* (Murr.) | + + + + − | + + + + + | + + + + | + + | |
| *Fusarium avenaceum* (Fr.) Sacc | + + + + + | + + + + | + + + | + + + | + |
| *Fusarium lini,* Bolley | + + + + + | + + + + + | + + + + | + + + | + |
| *Fusarium vasinfectum,* Atk. | + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + |
| *Graphium ulmi,* Schwarz | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + |
| *Leptosphaeria herpotrichoides* de Not. | + + + + + | + + + + + | + + + + | + + + | + + |
| *Pestalozia* sp. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + | + + + |
| *Rhizoctonia solani,* Kühn | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + |
| *Rosellinia necatrix* (Hart.) Berl. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + |
| *Sclerotium Rolfsii,* Sacc. | + + + + + | + + + + + | + + + | + + | − |
| *Sphaeropsis dalmatica* (Thüm.) Gig. | + + + + + | + + + + + | + + + + | + + | + |
| *Trichothecium roseum,* Link. | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + + | + + + + |
| *Verticillium albo-atrum* R. et Berth. | + + + + + | + + + + + | + + + + | + + + + | + + + |

Anche in questa prova le specie più sensibili all'azione della citrinina si sono dimostrate *Sclerotium Rolfsii* e *Endothia parasitica* che vengono inibite nel loro sviluppo appena la quantità del composto presente nel mezzo si aggiri sui μg 1000 per ml.

Altre specie il cui sviluppo è apparso molto tardo e limitato sono state: *Fusarium avenaceum, Fus. lini, Sphaeropsis dalmatica.*

A complemento di questa ricerca si è voluto vedere l'eventuale azione fitodinamica della citrinina quale essa appare al saggio di Macht. È noto come questo saggio si conduca seguendo comparativamente lo sviluppo del germinello di

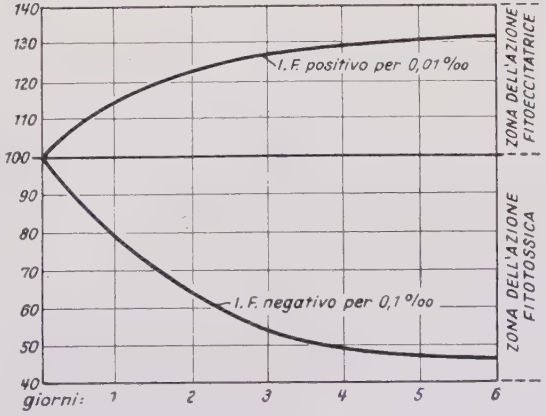



Fig. 6. Indice fitodinamico della citrinina per concentrazioni dello 0,1 ‰ e dello 0,01 ‰

lupino in liquido di Shive contenente o non contenente il composto in prova (3).

Abbiamo saggiata la dose minima dello 0,01 ‰ e la dose massima dello 0,1 ‰ ottenendo i seguenti risultati:

| | all'inizio | dopo giorni | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| I. A. (Indice di allungamento) | | | | | | | |
| controllo ..... | 100 | 130 | 167 | 209 | 245 | 266 | 290 |
| citrinina 0,01‰ ..... | 100 | 153 | 210 | 262 | 309 | 342 | 382 |
| citrinina 0,1‰ ..... | 100 | 107 | 109 | 111 | 120 | 126 | 142 |
| I. F. (Indice fitodinamico) | | | | | | | |
| citrinina 0,01‰ ..... | | 117 | 122 | 125 | 126 | 128 | 132 |
| citrinina 0,1‰ ..... | | 82 | 65 | 53 | 48 | 47 | 48 |

Risulta che piccole quantità di citrinina manifestano azione fitoeccitatrice, ma che più forti quantità (0,1 ‰) manifestano invece azione fitotossica.

Successivamente si è voluto meglio vedere l'azione esercitata dal composto sulla germinazione dei semi. L'esperienza è stata condotta su cariossidi di frumento, semi di trifoglio e glomeruli di barbabietola da zucchero. 200 dei ricordati semi sono stati tenuti immersi per 1 ora, 3 ore o 6 ore in soluzioni di citrinina allo 0,1—0,5—1 ‰. Tolti dalla soluzione i semi venivano

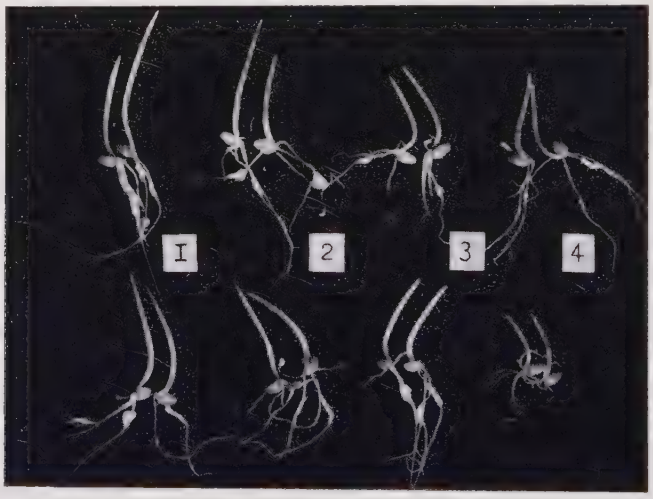



Fig. 7. Cariossidi di frumento germinate previa immersione per 1 ora (in alto) e per 6 ore (in basso) in acqua [1] oppure in soluzione di citrinina allo 0,1 ‰ [2], allo 0,5 ‰ [3] e all' 1 ‰ [4]

lavati in acqua distillata e quindi messi in germinatoio. Parallelamente altri semi, come controllo, erano tenuti immersi un'ora, tre ore o sei ore in acqua di fonte.

Questa prova di germinabilità ha dato i seguenti risultati:

| | n° di semi germinati (%) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | dopo 1h. d'immersione in: | | | | dopo 3 h. d'immersione in: | | | | dopo 6 ore d'immersione in: | | | |
| | acqua | citrinina | | | acqua | citrinina | | | acqua | citrinina | | |
| | | 0,1‰ | 0,5‰ | 1‰ | | 0,1‰ | 0,5‰ | 1‰ | | 0,1‰ | 0,5‰ | 1‰ |
| Frumento | | | | | | | | | | | | |
| al 2° g. ..... | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 94 | 96 | 82 | 80 | 72 |
| al 3° g. ..... | — | — | — | — | — | — | — | 98 | 98 | 98 | 96 | 92 |
| | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98 | 98 | 98 | 96 | 92 |
| Trifoglio | | | | | | | | | | | | |
| al 1° g. ..... | 88 | 82 | 81 | 80 | 92 | 84 | 81 | 80 | 90 | 88 | 86 | 83 |
| al 2° g. ..... | 100 | 86 | 88 | 86 | 98 | 88 | 86 | 85 | 100 | 90 | 90 | 88 |
| al 3° g. ..... | — | 98 | 99 | 97 | 100 | 98 | 99 | 96 | — | 98 | 97 | 94 |
| | 100 | 98 | 99 | 97 | 100 | 98 | 99 | 96 | 100 | 98 | 97 | 94 |
| B. bietola | | | | | | | | | | | | |
| al 2° g. ..... | 48 | 51 | 46 | 48 | 52 | 42 | 40 | 36 | 46 | 48 | 44 | 42 |
| al 3° g. ..... | 66 | 68 | 65 | 64 | 68 | 65 | 62 | 61 | 64 | 61 | 60 | 52 |
| al 4° g. ..... | 72 | 75 | 70 | 71 | 74 | 71 | 72 | 70 | 71 | 69 | 62 | 60 |
| al 5° g. ..... | 78 | 79 | 72 | 73 | 79 | 77 | 78 | 78 | 76 | 73 | 68 | 65 |

Si osserva che, anche per le concentrazioni maggiori e i maggiori tempi di immersione, la germinabilità non risente notevole danno. Si noti che la maggiore concentrazione saggiata (1 ‰) deve ritenersi relativamente elevata.

Tuttavia, in qualche caso, l'energia germinativa si abbassa mentre le plantule che hanno subito più a lungo l'azione del composto o l'azione del composto a maggiori concentrazioni mostrano, a conferma di quanto in precedenza è stato rilevato, un più ridotto sviluppo rispetto ai controlli.

## Riassunto

Viene segnalato un caso di antagonismo tra *Sclerotium Rolfsii* e *Penicillium citrinum*. Tale antagonismo è spiegato con la produzione, da parte di *Pen. citrinum*, di citrinina.

È stata allora sperimentata l'azione della citrinina pura su vari funghi fitopatogeni. È risultato che i funghi più sensibili verso questo composto sono lo *Sclerotium Rolfsii* e la *Endothia parasitica*.

Finalmente è stata ricercata l'azione fitodinamica della citrinina e la sua influenza sulla germinazione dei semi.

## Zusammenfassung

Es wird über einen Fall von Antagonismus zwischen *Sclerotium Rolfsii* und *Pen. citrinum* referiert, mit der Bildung von Citrinin seitens des *Pen. citrinum* erklärbar.

Die Wirkung des reinen Citrinin über mehrere phytopathogene Pilze wurde geprüft: *Sclerotium Rolfsii* und *Endothia parasitica* ergaben sich als die empfindlichsten der geprüften Pilze.

Es wurde endlich die phytodynamische Wirkung des Citrinin und sein Einfluß über die Germination der Samen untersucht.

## Summary

A case of antagonism between *Sclerotium Rolfsii* and *Penicillium citrinum* is pointed out. The antagonism above mentioned is shown because *Pen. citrinum* yields citrinine.

And it was experimented the action of pure citrinine on some phytopatogenic moulds. The result was that the most sensitive moulds to that compound are *Sclerotium Rolfsii* and *Endothia parasitica.*

At last the phytodinamic action of citrinine and its influence on germination of seeds have been researched.


## Bibliografia


1. AMBROSE, A. M. e DE EDS, F., 1945. Acute and subacute toxicity of pure citrinin. Soc. Exptl. Biol. and Med. Proc., **59**, 289.
2. BAILEY, J. H. e CAVALLITO, C. J., 1943. Production of citrinin. Journ. Bact. **45**, 30.
3. CIFERRI, R. e BERTOSSI, F., 1949. Il testo di Macht per il dosaggio dell'attività fitodinamica. Experientia, **5**, 289.
4. COYNE, F. P., RAISTRICK, H. e ROBINSON, R., 1931. Studies in the Biochemistry of Microorganisms. XV: The molecular Structure of Citrinin. Phil. Trans. of the Royal Society of London, Ser. B., **220**, 297.
5. EWART, A. J., 1933. The presence of citrinin in Crotolaria crispata. Ann. Bot., **47**, 913.
6. HETHERINGTON, A. C. e RAISTRICK, H., 1931. Studies in the Biochemistry of Microorganisms. XIV: On the production and chemical constitution of a new yellow colouring matter, citrinin, produced from glucose by *Pen. citrinum* Thom. Philosoph. Trans. of the Royal Soc. of London. Ser. B., **220**, 269.
7. MICHAELIS, M. e THATCHER, F. S., 1945. The action of citrinin on some respiratory enzymes of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli.* Arch. Biochem., **8**, 177.
8. OXFORD, A. E., 1942. Antibacterial substances from moulds; the bacteriostatic powers of the mould products citrinin and penicillic acid. Chem. a Ind., **61**, 48.
9. RAISTRICK, H. e SMITH, G., 1941. Antibacterial substances from moulds; citrinin, a metabolic product of *Pen. citrinum.* Chem. a Ind., **60**, 828.
10. TIMONIN, M. J. e ROUATT, J. W., 1944. Bacteriostatic activity of citrinin in vitro. Canad. Pub. Health Journ., **35**, 396.
11. TIMONIN, M. J. e ROUATT, J. W., 1944. Production of citrinin by *Aspergillus* sp. of the candidus group. Canad. Pub Health Journ., **35**, 80.

*Aus dem Biologischen Laboratorium der Dr. R. Maag A. G., Dielsdorf-Zürich, Schweiz*

# 10 Jahre Versuche zur Bekämpfung des Apfelmehltaues (*Podosphaera leucotricha* [E. et E.] Salm.)

Von

L. Zobrist und H. Fröhlich

*Mit 4 Abbildungen*

Neben der Schorfkrankheit ist der Apfelmehltau in der Schweiz als die gefährlichste pilzparasitäre Erkrankung der Apfelbäume anzusehen. In den letzten 15 Jahren des verheerenden Auftretens hat diese Pilzkrankheit sowohl im Erwerbsobstbau als auch in Baumschulen immer mehr epidemischen Charakter bewiesen und nimmt an Bedeutung sogar noch zu, indem von Jahr zu Jahr neue Sorten an Mehltau erkranken. Dies veranlaßte dann auch die Obstbaupraxis, von unseren wertvollsten, aber auch gleichzeitig mehltauanfälligsten Sorten einige, wie z. B. Jonathan und Gravensteiner, einzuschränken oder schon bestehende Bäume umzupfropfen. Die Erhaltung dieser Sorten machte die Bekämpfung somit immer mehr zu einem dringenden Problem.

Während es gelingt, das epidemische Auftreten des Schorfpilzes durch systematische Bespritzungen mit bestimmten Mitteln praktisch vollständig einzudämmen, besteht für die Mehltaubekämpfung noch kein spezifisches Mittel, wohl aber eine Methode, die den Bäumen wieder ein freudiges Trieb-

Abb. 1. Apfelmehltau. Fruchttrieb mit normalem, gesundem und mehltaubefallenem Blütenbüschel (rechts). Primärinfektion: fleischig verdickte Kronblätter. Oberseite der Laubblätter mit einem weißen Myzelbelag bedeckt

wachstum zurückgibt und eine normale Ernte gewährleistet. Dieser Bekämpfungserfolg ist durch eine einjährige Behandlungsfolge jedoch nicht erreichbar, sondern nur durch eine mehrjährige Kur.

### 1. Krankheitsbild und Hinweise für die Bekämpfung

Wo sich der Apfelmehltau einmal festgesetzt hat, ist es schwierig, ihn wieder wegzubringen. Dies hängt mit der Biologie des Pilzes zusammen. Der Erreger, *Podosphaera leucotricha* (E. et E.) Salm., überwintert als Pilzgeflecht im Schutze der Knospenschuppen und an den einjährigen Trieben (WOODWARD, 1927). Demnach sollte er eigentlich durch die Vorblütespritzungen bekämpfbar sein. Nun sind aber die auffälligen Primärinfektionen, die mit der aufbrechenden Knospe schon auf den jungen Blättern erscheinen, durch den dichten Haarfilz und durch die geringe Benetzbarkeit der Knospe geschützt und nur schwer durch die Spritzbrühe zu erreichen. Die gewöhnlichen Vorblütespritzungen gegen Schorf zeitigten denn auch gar keinen Erfolg. Eine Maßnahme gegen den Mehltau verlangt somit gegenüber der Schorfbekämpfung eine besser benetzende Spritzbrühe und ein „Durchwaschen" des Baumes und damit nahezu den doppelten Brüheverbrauch gegenüber normaler Schorfspritzung. Damit sind aber die Blüten nicht gerettet, denn auch Blütenknospen können schon die Infektion in sich tragen. Die sich aus infizierten Knospen entfaltenden Kronblätter sind fleischig verdickt und verfärben sich unter dem Pilzbefall grün; Kelch und Stiel bedecken sich später mit einem dichten Sporenbelag (Abb. 1). Solche Blüten verkümmern und vertrocknen.

Abb. 2. Apfelmehltau. Zweigspitze mit Primärinfektionen (verkrüppelte Blättchen der Endknospe) und Sekundärinfektionen (auf der Unterseite der kahnförmig aufgerichteten Blätter)

An den mehr oder weniger ausgewachsenen Blättern erscheinen während und nach der Blüte die Sekundärinfektionen. Der Pilz überzieht dann die ganze Oberfläche des Blattes mit seinem Myzel; dadurch rollen

sich die Blätter kahnförmig nach oben ein und fallen durch ihr steiles Aufgerichtetsein auf (Abb. 2). Dabei wird die Blattunterseite dem Licht ausgesetzt, und als indirekte Folge des Mehltaubefalles tritt eine rötliche Verfärbung (Anthozyan-Bildung) der Blattunterseite auf. Da der Pilz die Kutikula der Blätter verletzt, bräunen sich im Laufe des Sommers diese erkrankten Blätter, rollen sich noch stärker ein, vertrocknen vom Rande her und fallen vorzeitig ab.

Apfelbäume, welche die oben erwähnten Symptome der Mehltaukrankheit tragen, erscheinen locker in der Belaubung; vor allem ist die graubräunliche, nicht frisch-grüne Kronenfarbe auffallend. Kahle Stellen an den Zweigen sind ein weiteres Kennzeichen und verleihen im fortgeschrittenen Befallsstadium dem Baum ein struppiges Aussehen. Der Schaden, der durch den Mehltaupilz angerichtet wird, besteht in der Deformation der Blüten, somit im Ertragsausfall, in der Vernichtung der Blätter und im Abtöten des Jahreszuwachses (Abb. 3).

Durch die in Massen im weißen Belag auf der Blattoberseite produzierten Konidien wird einerseits die Krankheit auf weitere Blätter verbreitet, andererseits werden im Laufe des Vorsommers mit den Konidien auch die nächstjährigen Knospen infiziert (WOODWARD, 1927).

Eine Reduktion dieser Sekundär- und weiteren Folgeinfektionen müßte sich demnach auf den nächstjährigen Befall auswirken. Daraus ergibt sich das Ziel der Bekämpfungsmaßnahmen, das darin bestehen soll, durch spezifische Nachblütespritzungen die Folgeinfektionen auf ein Minimum zu reduzieren, um einerseits Knospeninfektionen zu verhindern und andererseits das neu sich entwickelnde Blattwerk vor Befall zu schützen.

Abb. 3. Apfelmehltau.
Links: unbehandelt, Langtrieb vollständig entlaubt. Blätter mit Sekundärbefall. Rechts: behandelt, normaler Austrieb

Neben der oben erwähnten Überwinterung des Myzels in den Knospen und an den einjährigen Trieben bildet der Pilz auch Perithezien aus, die aber nur e i n e n Ascus mit acht Ascosporen enthalten. Diese Hauptfruchtform tritt

Abb. 4. Jahrestrieb mit Perithezien des Mehltaupilzes *(Photos M. Dickenmann, Photoarchiv Dr. R. Maag A.G.)*

bei uns im allgemeinen selten auf. Immerhin war es auffällig, daß nach dem heißen Sommer 1949 diese Perithezien recht häufig und vereinzelt auch im Herbst 1950 an den befallenen einjährigen Trieben auftraten. Gelegentlich waren die Triebe von dem braunen Filz der Fruchtkörper dicht überzogen (Abb. 4). Nach dem letztjährigen nassen und relativ kühlen Sommer fanden wir keine Perithezien, obschon wir ein besonders ausgeprägtes Mehltaujahr hinter uns hatten. Obwohl die Literatur über die Keimung und Infektionstüchtigkeit der Ascosporen noch nichts Sicheres zu berichten weiß (WOODWARD, 1927; BLUMER, 1949), erscheint es uns doch wahrscheinlich, daß dieser Sporenform für die zunehmende Verseuchung eine gewisse Bedeutung zukommen muß.

### 2. Einfluß der Sorten und der Umweltbedingungen

Nach landläufiger Ansicht wird die Entwicklung des Apfelmehltaues durch trockenes und warmes Frühlingswetter begünstigt, also durch Bedingungen, die 1951 in der Schweiz sicher nicht erfüllt waren, und trotzdem trat der Mehltau in verschiedenen Gebieten in einer Stärke auf, wie sie sich in den vergangenen 20 Jahren nicht feststellen ließ. Was wir 1951 aber an Triebinfektionen, d. h. Primärinfektionen beobachteten, war das Erbe des Vorjahres; die Knospen-Infektionen waren ja schon im Sommer 1950 erfolgt, sie mußten also beim Knospenaufbruch, unabhängig vom Wetter, sichtbar werden. Auffällig war aber auch, trotz des kühlen Vorsommers, das starke Auftreten von Sekundärinfektionen und im weiteren das Übergreifen auf Sorten, wie z. B. Glockenapfel, der bis dahin vom Mehltau nicht befallen wurde und als weitgehend widerstandsfähig galt. Desgleichen beobachteten wir ein verstärktes Auftreten an Sorten wie Boskoop, Goldparmäne, Sauergrauech, Bohnapfel, Winterzitrone, Golden Delicious, die bis dahin als mittelstark bis schwach anfällig betrachtet wurden. Stärker befallen wurden, neben den bekannt stark anfälligen Sorten Jonathan und Gravensteiner, vor allem Boiken, Weißer Winterkalvill, Cox's Orangen Renette, Landsberger Renette und Ontario.

Nach unseren Beobachtungen fördert Nährstoffmangel und Standort auf leichten Böden die Anfälligkeit. Nach Aufpfropfen bleiben hingegen auch anfällige Sorten eine Zeitlang befallsfrei. Auf stark wüchsigen Unterlagen scheint die Anfälligkeit geringer zu sein als auf schwach wüchsigen.

### 3. Bekämpfungsmaßnahmen

a) Vorversuche

Unsere ersten Bekämpfungs-Versuche datieren aus dem Jahre 1939. Nach eigenen Beobachtungen und Meldungen aus der Praxis nahm der Mehltaubefall in den durch Föhn begünstigten Obstbaugebieten um Chur und Malans, im Kanton Graubünden, seit 1937 ständig zu, und zwar derart, daß wir an den Sorten Gravensteiner, Landsberger Renette und Klarapfel zwischen 40 bis 50 % durch Mehltau zerstörte Blatt- und Blütenknospen ermitteln konnten. Gleichzeitig machten wir aber auch die Feststellung, daß nach den verschiedenen Winterbehandlungen, wie bei der kombinierten Winterspritzung mit 4 % Obstbaum-Karbolineum + 2 % Kupferoxychlorid oder bei der Braunspritzung, kurz nach dem Austrieb, mit 2 % Schwefelkalkbrühe + 2 % Kupferoxychlorid oder auch bei Verwendung von 5 % Schwefelkalkbrühe allein oder bei Behandlungen mit Öl-Emulsionen + Kupfer, ein gleich starker Befall resultierte wie bei den unbehandelten Bäumen. Die verschiedenen Winterbehandlungen, insbesondere die Kupfer-Vorratsspritzungen gegen Schorf, hatten also keinen Einfluß auf das Auftreten des Apfelmehltaues.

Die Stärke des Befallsgrades im Gebiete des Kantons Graubünden verlangte aber nach Sofortmaßnahmen. Wir versuchten deshalb, den schon vorhandenen Mehltaubefall aufzuhalten oder gar einzudämmen und verwendeten dazu einerseits Schwefelkalkbrühe + Netzmittelzusatz, andererseits verdünnte Kupferkarbonatbrühe + Netzmittel, wie sich letztere Mischbrühe zur *Oidium*-Bekämpfung an Lorraine-Begonien und Rosen vorzüglich bewährt hatte, oder auch die Kombination von beiden, Schwefelkalkbrühe + Kupferkarbonat + Netzmittel. Obschon diesen kupferhaltigen Brühen eine gute Wirkung gegen die Ausbreitung der Sekundärinfektionen nicht abzusprechen war, mußten wir die Behandlungen nach der zweiten Nachblütespritzung wegen unliebsamer Kupferreizungen an Blättern und Berostungen an Früchten der Sorten Kanada Renette und Gravensteiner einstellen. Jene Bäume aber, die zwei Nachblütespritzungen mit gut benetzender Schwefelkalkbrühe und zwei Obstmadenspritzungen mit 0,5 % Schwefelkalkbrühe + 0,5 % Bleiarsenat + Netzmittel-Zusatz erhalten hatten, zeigten im Spätsommer einen geringeren Befall an Mehltau, ein gesünderes Triebwachstum als nur normal gegen Schorf durchbehandelte Bäume und fielen durch ihre dunkelgrüne Belaubung auf. Gegenüber den Schorfspritzungen war aber nicht nur die Brühe durch Netzmittelzusatz verändert, sondern auch die Technik der Spritzung wurde dem Mehltau angepaßt, indem man danach trachtete, nicht allein auf den Blättern einen Fungizid-Belag zu schaffen, sondern auch die vom Mehltau befallenen Triebpartien gründlich zu waschen.

Unsere ersten Bemühungen in der Mehltaubekämpfung brachten uns somit folgende wichtigen Feststellungen: 1 % Schwefelkalkbrühe 32 ° Bé +

Netzmittel, als Sommerbehandlung, konsequent angewendet, bringt eine sichtbare Reduktion der Sekundärinfektionen, vorausgesetzt, daß der Baum gründlich mit der Brühe durchgewaschen wird. Selbstverständlich wurde damit auch gleichzeitig ein vollständiger Schutz gegen Schorf und eine Eindämmung der Roten Spinne erreicht. Kontrollen an derart behandelten Bäumen zeigten im folgenden Jahr zudem noch einen merklich verminderten Primärbefall und damit wieder einen besseren Fruchtansatz.

Weiterhin machten wir die Feststellung, daß mit einer Verstärkung des Belages, d. h. mit einer Erhöhung des fungiziden Wirkstoffes je Blatteinheit auch eine Verbesserung der Wirkung gegen den Mehltau erreicht werden müßte. Nun war es aber wegen der Verbrennungsgefahr nicht ohne weiteres möglich, die Schwefelkalkbrühe-Konzentration von 1 % auf 2 % zu erhöhen. Wir prüften deshalb 1945 erstmals die Verwendbarkeit eines netzbaren Schwefels, in einer Form, wie er damals im Weinbau als Zusatz zur Bordeaux-Brühe zur Bekämpfung von *Oidium Tuckeri* Verwendung fand. Obschon die Regenbeständigkeit dieses Produktes in keiner Weise befriedigte, ließ sich damit doch eine recht beachtliche Verminderung an Sekundärinfektionen erzielen. Überraschend waren die guten Resultate von drei Nachblütespritzungen mit netzbarem Schwefel und zwei Obstmadenbehandlungen mit Schwefelkalkbrühe + Bleiarsen + Netzmittel bei der Sorte Jonathan. Da dieser netzbare Schwefel der ungenügenden Regenbeständigkeit wegen nicht befriedigte, wurde durch Ausarbeitung eines eigentlichen mikronisierten Netzschwefels (70 % Schwefel), ein für die Mehltaubekämpfung geeignetes Produkt geschaffen. In den folgenden beiden Jahren konnte durch zahlreiche Versuche abgeklärt werden, daß dieser Netzschwefel, wie er heute auch zur Schorfbekämpfung gebräuchlich ist, zusammen mit Netzmittel, in entsprechender Behandlungsfolge und Spritztechnik, den Mehltau „kuriert" und in der Wirkung gegen Schorf der Schwefelkalkbrühe ebenbürtig ist. Damit war die Grundlage für die Mehltaubekämpfungsmethode gelegt, wie wir sie seit 1948 allgemein empfehlen.

b) Behandlungsprogramm und mechanische Maßnahmen

Zwischen Austrieb und Blüte sind die Bäume mindestens zweimal in Abständen von zehn Tagen mit 0,75 % Netzschwefel + 0,2 % Netzmittel zu „waschen", d. h. gründlich mit der doppelten Brühemenge, wie sie für die entsprechende Schorfbehandlung nötig ist, zu spritzen. Die erste Behandlung sollte gleich nach Öffnen der Knospen, die zweite unmittelbar vor dem Aufblühen ausgeführt werden. Nach unseren Versuchen bringt eine Vermehrung der Vorblütebehandlungen keine Verbesserung des Erfolges. Sofort nach dem Abblühen muß mit der gleichen Brühezusammensetzung und mit der gleichen Gründlichkeit erneut behandelt werden. Die rasche Aufeinanderfolge von Vor- und Nachblütespritzung ist sowohl für den Erfolg der Mehltau-, als auch für den der Schorfbekämpfung von ausschlaggebender Bedeutung. Das Hauptgewicht liegt jedoch nach unseren Erfahrungen der letzten drei Jahre auf den Sommerbehandlungen, mit welchen die Bildung von Sekundärinfektionen verhindert werden soll. Eine zweite Nachblütespritzung (mit 0,5 % Netzschwefel + 0,2 % Netzmittel) ist des-

halb für die Mehltaubekämpfung unumgänglich. Bei starkem Primärbefall und anfälligen Sorten, wie Jonathan, Gravensteiner usw., empfiehlt sich sogar eine dritte Nachblütebehandlung.

Diese Spezialmaßnahmen dürfen im Laufe des Sommers nicht aufgegeben werden; demzufolge sind auch die Obstmadenspritzungen mit Zusatz eines Netzmittels auszuführen.

Durch diese Behandlungen soll einerseits der Pilz in den Primärinfektionen, die das Sporenreservoir für die weitere Streuung bilden, mit dem Fungizid erfaßt werden, andererseits soll das junge Blatt und die heranwachsende Knospe durch den Schwefelbelag vor einem Pilzbefall geschützt werden.

Wo es sich durchführen läßt, können diese chemischen Behandlungen durch folgende mechanischen Maßnahmen ergänzt werden:

Das Herausschneiden aller mehltaukranken, an der grau-weißen Rinde erkennbaren Zweige beim Winterschnitt bietet keine Gewähr, denn damit hat man nur die Spuren der letztjährigen Verseuchung beseitigt. Nachdem wir nämlich im Herbst Hunderte solcher Triebe markiert hatten, machten wir die Feststellung, daß nur ein relativ geringer Teil davon Primärinfektionen trägt. Ob der *Oidium*-Hyperparasit *Cicinnobolus Cesatii* de By. für das unregelmäßige Auftreten verantwortlich ist, muß in Spezialversuchen noch abgeklärt werden.

Durch das Herausschneiden der Primärinfektionen, d. h. der mehltaukranken Blatt- und Blütenknospen, unmittelbar nach dem Austrieb, kann die Verbreitung der Konidien, welche die Sekundärinfektionen auslösen, wirksam verhindert werden. Dies stellt jedoch ein Verfahren dar, das in Großbetrieben oder auch schon bei einzelnen Hochstammbäumen wegen des großen Arbeitsaufwandes undurchführbar ist und sich nur bei Buschbäumen und Spalieren lohnt.

## 4. Ergebnisse der Versuche 1946 bis 1951

Einer unserer Mehltau-Versuche an gleichaltrigen Bäumen der Sorte Jonathan steht im fünften Versuchsjahr. Die Bäume erhalten die gleiche Düngung, den normalen Winterschnitt und eine Winterspritzung mit Gelbkarbolineum. Nach Austrieb werden selbstverständlich die Primärinfektionen nicht weggeschnitten. Als Bekämpfungsmaßnahmen gegen den Mehltau folgen zwei Vor- und zwei Nachblütespritzungen, zwei Obstmadenbehandlungen, sowie eine Spätspritzung, wobei für sämtliche Applikationen Netzschwefel + Netzmittelzusatz verwendet wird. Diese Behandlungsfolge wird verglichen mit a) Netzschwefel ohne Netzmittelzusatz, b) seit fünf Jahren unbehandelten und c) nur 1951 unbehandelt belassenen Bäumen.

Die Resultate (vgl. Tab. 1) sind wie folgt:

Der während fünf Jahren unbehandelte Baum zeigte beim Austrieb 99 % Primärinfektionen, d. h. befallene Langtriebe und Blüten und hatte Ende September dazu einen beinahe 100 %igen Sekundärbefall aufgewiesen. Sein Aussehen war demzufolge durchsichtig, locker und grau in der Belaubung; er war ohne Triebwachstum und trug nur vereinzelte Früchtchen.

*Tabelle 1*

Verlauf der Mehltau-Sekundärinfektionen während der Vegetationsperiode 1951

Versuchsbäume: Sorte Jonathan
Ausgezählte Blattbüschel pro Kontrolle und Baum: im Minimum 700
Spritzdaten:

| | | | |
|---|---|---|---|
| 2 Vorblütespritzungen: | 11. 4. u. 1. 5. | mit 0,75 % Netzschwefel | (+ 0,2 % Netzmittel) |
| 1. Nachblütespritzung: | 23. 5. | 0,75 % „ | (+ 0,2 % „ ) |
| 2. „ : | 5. 6. | 0,50 % „ | (+ 0,2 % „ ) |
| 2 Obstmadenspritzungen: | 20. 6. u. 11. 7. | 0,50 % „ | + 0,5 % Bleiarsenat (+ 0,2 % Netzmittel) |
| 1 Spätspritzung: | 10. 8. | 0,50 % „ | (+ 0,1 % „ ) |

Ort: Versuchsanlagen Dielsdorf

| Behandlungsfolge | Primärinfektion in % am 21.5. | Sekundärinfektionen in % am 21.5. | 29.6.* | 20.7.* | 24.8.* | 25.9.* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Unbehandelt (während 5 Jahren) | 99 | 19 | 26 | 46 | 68 | 97 |
| Unbehandelt 1951 (während 4 Jahren behandelt) | 13 | 13 | 15 | 49 | 60 | 68 |
| Netzschwefel ohne Netzmittelzusatz | 17 | 9 | 10 | 13 | 21 | 32 |
| Netzschwefel + Netzmittelzusatz | 15 | 3 | 1 | 1 | 3 | 5 |

* befallene Blätter zum Teil abgefallen.

Die in der Literatur vertretene Ansicht, es handle sich beim Apfelmehltau um eine ausgesprochene Frühjahrs- und Vorsommer-Erkrankung, fanden wir nicht bestätigt. Am 21. Mai zählten wir an einem unbehandelten Baum 19 % Sekundärinfektionen, die bei der zweiten Kontrolle am 29. Juni auf 26 % angestiegen waren, sich bei der dritten, einen Monat später, auf 46 %, Ende August auf 68 % erhöht hatten und bei der letzten Auszählung, am 25. September, 97 % erreichten.

Ein während vier Jahren behandelter, aber 1951 unbehandelt belassener Baum, zeigte im Frühjahr nur vereinzelte Primärinfektionen (13 %), gegenüber 99 % bei dem während fünf Jahren unbehandelten Baum, wies aber Ende September einen Sekundärbefall von 68 % auf und stand zudem in einem nur beschränkten Triebwachstum. Die vorangegangene vierjährige Kur hat die Primärinfektionen niedrig gehalten; ohne fungiziden Schutz des Blattwerkes hatte sich aber ein beachtlicher Sekundärbefall herausgebildet, so daß das Triebwachstum ins Stocken kam. Diese Beobachtung zeigt, daß die „Mehltau-Kur" auch in Zeiten geringen Fruchtbehanges nicht aufgegeben werden darf.

Jonathan-Bäume, die nun während fünf Jahren die „Mehltau-Kur" erhalten hatten, zeichneten sich durch dunkelgrüne, große Blätter, kräftiges Triebwachstum und einen vollen Fruchtbehang aus. Auszählungen bei Austrieb ergaben 15 % Primärinfektionen und Ende September einen Sekundärbefall durch Mehltau von 5 %. Durch die intensive „Mehltau-Kur", wie vorgängig erwähnt mit sieben Spritzungen mit gut benetzender Netzschwefel-Brühe, konnte das Blattwerk derart geschützt werden, daß am Ende der Vegetationsperiode nur ein ganz geringer Befall festgestellt werden konnte,

bei gleicher Ausgangsstellung wie bei dem vorerwähnten, nur dieses Jahr unbehandelt belassenen Baum.

In einer zweiten Versuchsgruppe stehen Bäume, welche die gleiche Anzahl Spritzungen mit der gleichen Intensität erhalten haben, aber ohne Netzmittelzusatz. Diese trugen im Herbst einen bis sechsmal so starken Mehltaubefall, so daß die Notwendigkeit des Netzmittelzusatzes bewiesen ist.

Wo in der Praxis die erwähnte Mehltau-Bekämpfungsmethode mit stark benetzender Netzschwefel-Brühe in den letzten Jahren gewissenhaft durchgeführt wurde, konnten auch 1951 gute Resultate verzeichnet werden. Dies war um so wertvoller in einem ausgesprochenen Mehltaujahr, wo trotz nassem Frühling und Sommer die Mehltauschäden eher größer waren als in den Vorjahren. 1951 unbehandelt gelassene Jonathan-Bäume brauchen wohl mehrere Vegetationsperioden intensiver Behandlung, um sich wieder zu erholen.

In unseren Versuchen konnten wir weiterhin feststellen, daß Präparate auf Thiuram- oder Thiocarbamat-Basis keine Wirkung gegen den Apfelmehltau besitzen, diesen aber auch nicht fördern, wie dies von Praktikern gelegentlich vermutet wird.

Wenn es auch bis jetzt nicht gelingt, den Mehltau vollständig zu bekämpfen, so lassen sich auf Grund unserer eigenen Versuche und der zahlreichen praktischen Erfahrungen doch die Bäume in einen Zustand zurückführen, in dem sie durch die „Netzschwefelmethode" wieder ein normales Triebwachstum aufweisen und jährlich wiederum eine gute Ernte bringen. Soll dieser Erfolg weiterbestehen, so darf mit den Spezialbehandlungen, nach Eintreten der Besserung, auch in späteren Jahren nicht nachgelassen werden.

## Zusammenfassung

Der Apfelmehltau hat im gesamten schweizerischen Obstbaugebiet in den letzten Jahren an epidemischem Charakter zugenommen.

Der Mehltaupilz überwintert als Pilzgeflecht im Schutze der Knospenschuppen und an den einjährigen Trieben.

Inwieweit die Ascosporen für die Neuinfektion verantwortlich gemacht werden können, ist noch nicht abgeklärt.

Mit der Winterspritzung kann der Mehltaupilz höchstens an den Trieben, nicht aber in den Knospen vernichtet werden.

Die Primärinfektionen treten, als Erbe des Vorjahres, unter allen Umständen auf; sie können beim Knospenaufbruch nicht mehr verhindert werden. Die Bekämpfungsmaßnahmen müssen sich somit gegen eine Ausbreitung der Sekundärinfektionen richten.

Der dichte Myzelfilz verlangt eine sehr gut benetzende Spritzbrühe, was durch Netzmittelzusatz erreicht wird. Im Gegensatz zur normalen Schorfspritzung müssen die Bäume „gewaschen" werden; dies erfordert einen doppelten Verbrauch an Spritzbrühe.

Mikronisierter Netzschwefel ergab in mehrjährigen Versuchen die besten Bekämpfungserfolge, und zwar bei sieben Spritzungen mit Netzmittelzusatz.

Rasche Aufeinanderfolge von Vor- und Nachblütespritzungen sind für den Erfolg maßgebend, sowie eine Fortsetzung der Behandlungsmethode während mehrerer Jahre.

Mit diesem Verfahren ist gleichzeitig eine gute Bekämpfung der Schorfkrankheit sowie der Roten Spinne gewährleistet.

Als mechanische Hilfsmaßnahmen kommt lediglich ein Herausschneiden der mit Primärinfektionen behafteten Langtriebe und Blütenknospen nach dem Austrieb, also im Frühjahr, in Frage. Der Winterschnitt der Bäume besitzt unseres Erachtens nur beschränkte Wirkung.

## Summary

The powdery mildew of apple, *Podosphaera leucotricha* (E. et E.) Salm., has in Switzerland developed to a serious disease and has shown during the past ten years more and more an epidemic character.

The fungus overwinters as dormant mycelium on twigs or in buds.

Research-work has not shown yet how great the part is which the ascospores play in the life cycle of this fungus.

The dormant spray destroys the mycelium overwintering on the twigs, but is inefficient against the mycelium in the buds.

The primary infections, due to the previous year's attack, will appear under all circumstances. Control depends on the inhibition of the extension of the secondary infections, caused by the conidia.

The thick felt-like conidiophores require a spray-mixture of a highly efficient wetting quality. The addition of a spreader is therefore necessary. Compared with usual applications of chemicals (e. g. as for the control of apple scab) the trees should be washed thoroughly with the double quantity of spraying mixture.

Micronized wettable sulfurs with addition of wetting agents showed by far the best results in the control of the powdery mildew of apple. 7 applications during the season are necessary.

Quick succession of the pre-blossom and petalfall-application is important for good results. Repetitions during a number of years can only guarantee a success.

Apple scab and European red spider mites are equally controlled by this method.

Mechanical help in the control of the apple mildew consists exclusively in pruning away all mildewed shoots immediately they are noticed in spring, after the buds have burst. The winter pruning has proved to have only secondary importance.

## Literaturverzeichnis

Blumer, S. und Lüthi, E., Der Apfelmehltau und seine Bekämpfung. Zeitschr. f. Obst- und Weinbau, **58**, Nr. 1, (23—25), 1949.

Blumer, S., Das Auftreten des Apfelmehltaus und seine Bekämpfung im Jahre 1951. Zeitschr. f. Obst- und Weinbau, **60**, Nr. 26, (501—505), 1951.

Gäumann, E., Pflanzliche Infektionslehre. Verlag Birkhäuser, Basel, 1951.

Woodward, R. C., Studies on *Podosphaera leucotricha,* Trans. Brit. Mycol. Soc. **12**, (173—204), 1927.

*Aus dem Institut für Pflanzenschutz*
*an der Landwirtschaftlichen Hochschule Hohenheim*
*Direktor: Prof. Dr. B. Rademacher*

# Untersuchungen über den Zwergsteinbrand

Von

K. Warmbrunn

*Mit 10 Abbildungen*

Inhalt: A. Einleitung. — B. Morphologische Merkmale und systematische Einstufung des Zwergsteinbrands. — I. Morphologische Merkmale. — II. Systematische Einreihung des Zwergsteinbrands. — C. Physiologie; a) Wirtspflanzenkreis, b) Keimverhältnisse, c) Infektion. — D. Einwirkung verschiedener Faktoren auf den Zwergsteinbrand; a) Einfluß von Lage und Boden, b) Einfluß von Saatgut und Sorte bei Weizen und Dinkel, c) Einfluß der Vorfrucht, d) Einfluß der Düngung, e) Einfluß der Saatzeit, Witterung und Bodenfeuchtigkeit, f) Verhalten gegen Saatgutbeizung, g) Verhalten zum gewöhnlichen Steinbrand. — E. Bekämpfung des Zwergsteinbrands; a) Kulturmaßnahmen, b) Sortenwahl, c) Anwendung chemischer Mittel. — F. Zusammenfassung. — G. Literaturverzeichnis.

## A. Einleitung

Seit dem Jahre 1930 tritt in Württemberg eine neuartige Steinbrandkrankheit auf, deren besonderes Merkmal der auffallende Zwergwuchs der befallenen Triebe ist. Diese Eigentümlichkeit hat der neuen Brandart den Namen „Zwergsteinbrand" oder „Kurzsteinbrand" eingetragen. In den Jahren bis etwa 1940 scheint sich das Auftreten des Zwergsteinbrandes in bescheidenen Grenzen gehalten zu haben. Er wurde seitdem aber vor allem auch in Bayern im Straubinger Weizenanbaugebiet und im bayerischen Schwaben in der Gegend von Babenhausen festgestellt. Die von S. Mehl von der Bayerischen Landesanstalt für Pflanzenbau und Pflanzenschutz über das Auftreten des Zwergsteinbrandes in den Jahren 1941 bis 1944 zusammengefaßten Berichte sind leider durch Kriegseinwirkung verlorengegangen. 1948 hat dann Wagner (49) über diese Brandart berichtet.

Auch in den Vereinigten Staaten ist der Zwergsteinbrand als *„dwarf bunt"* seit etwa 20 Jahren bekannt und wird von Young (53) im Jahre 1935 zum erstenmal erwähnt. Seitdem haben sich Holton, Bamberg und Rodenhiser mit ihm befaßt und insbesondere die Keimungsverhältnisse und die Frage der Resistenz studiert. Das Zwergsteinbrand-Gebiet in den Vereinigten Staaten umfaßt die Staaten Idaho, Montana, Utah, Washington und Wyoming im Nordwesten der USA. Vereinzeltes Auftreten wurde noch in Colorado und New York beobachtet (41).

In den folgenden Untersuchungen wird ein Beitrag zu unserer derzeitigen Kenntnis des Zwergsteinbrandes, seiner Verbreitung, seiner Abhängigkeit von äußeren Faktoren und der Möglichkeit der Bekämpfung gegeben.

## B. Morphologische Merkmale und systematische Einstufung des Zwergsteinbrands

### I. Morphologische Merkmale

1. Sporenform

Die Sporen unterscheiden sich nach YOUNG (53) und HOLTON (19) von denjenigen der *Tilletia tritici* dadurch, daß sie eine stärker hervortretende Netzung der Sporenwand aufweisen. Auch WAGNER (49) betont die stärkere Ausbildung der Netzleisten an den Sporen, die im Querschnitt wie gestachelt aussehen und im Gesamtdurchmesser dadurch größer erscheinen.

Der gewöhnliche Steinbrand wird in Deutschland hauptsächlich durch *T. tritici* (Bjerkander) Winter hervorgerufen, während *T. laevis* Kühn oder *T. foetens* (Berkeley et Curtis) Tulasne mehr in Südeuropa und den Vereinigten Staaten vorkommt. Die Sporen von *Tilletia tritici* sind nach ZILLIG (54) 0,016 bis 0,024 mm groß und sind mit 0,001 mm hohen Netzleisten bedeckt, die fünf- bis sechseckige unregelmäßige Maschen bilden. Die Sporen von *T. foetens* unterscheiden sich von diesen nur dadurch, daß sie eine ganz glatte Membran besitzen. GASSNER (12) und SAVULESCU (43) fanden in der Türkei bzw. Rumänien als Zwischenformen noch *T. tritici forma intermedia* und *T. triticoides,* die sich durch schwächere Netzleisten, *intermedia* außerdem durch geringere Maschenweite von *T. tritici* unterscheiden.

Durch eigene mikroskopische Untersuchungen konnte zunächst festgestellt werden, daß die Form der Zwergsteinbrandsporen sich nicht von der der *Tilletia*sporen unterscheidet. Sie ist meist rund, zuweilen auch oval oder etwas länglich. Die Netzung der Sporenwand ist allerdings erheblich stärker. Während ZILLIG (54) für die *Tilletia*sporen die Höhe der Netzleisten mit 0,001 mm angibt, schwankt diese Höhe bei den Zwergsteinbrandsporen zwischen 0,002 und 0,003 mm. GASSNER (12) stellte in der Türkei auch *Tilletia tritici*-Sporen mit Netzleistenhöhe von 0,0018 bis 0,002, ja bis 0,0025 mm fest. Über die übrigen Merkmale des Zwergsteinbrands wird dort jedoch nichts gesagt.

Die Felder zwischen den einzelnen Leisten sind in ihrer Form und Größe denen bei *T. tritici* sehr ähnlich, wie aus Abb. 1 zu ersehen ist.

Neben den gewöhnlichen Sporen treten nach HOLTON (19) in einem Anteil von 8,8 % sogenannte „hyaline" Sporen auf, die als sterile oder unreife Chlamydosporen angesehen werden. Auf Grund von Kultur- und Infektionsversuchen sieht HOLTON (19) in ihnen haploide Zellen. In den von mir in Württemberg gesammelten Proben aus den Jahren 1948 und 1949 waren solche hyaline Sporen auch zu beobachten. Von 1066 untersuchten Sporen (Herkunft Lützelalb, Kreis Göppingen) waren im Jahre 1948 4,1 % hyaline Sporen, während im Jahr 1949 unter 1127 Sporen (Herkunft Waldhausen, Kreis Ulm) ein Prozentsatz von 7,9 %, der etwa dem von

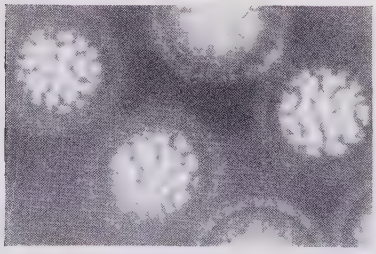


Abb. 1. Netzung der Zwergsteinbrandsporen (1000fach vergrößert)

Holton (19) festgestellten Anteil entspricht, zu finden war. Die hyalinen Sporen zeigen ganz unterschiedliche Größen und schwanken zwischen der halben bis zur vollen Größe der gewöhnlichen Zwergsteinbrandsporen und sind hell im Gegensatz zu den braunen gewöhnlichen Sporen. Es sind drei verschiedene Formen zu unterscheiden, nämlich hyaline Sporen mit einer einfachen, dann solche mit einer doppelt erscheinenden Wandung und schließlich solche, die dieselbe starke Netzung wie die gewöhnlichen Sporen aufweisen. Letztere unterscheiden sich morphologisch nur dadurch von den typischen Zwergsteinbrandsporen, daß sie deren braune Färbung nicht aufweisen. In Abb. 2 ist etwas rechts oberhalb der Mitte eine hyaline Spore mit doppelt erscheinender Wandung und auf Abb. 3 eine solche mit starker Netzung zu sehen.

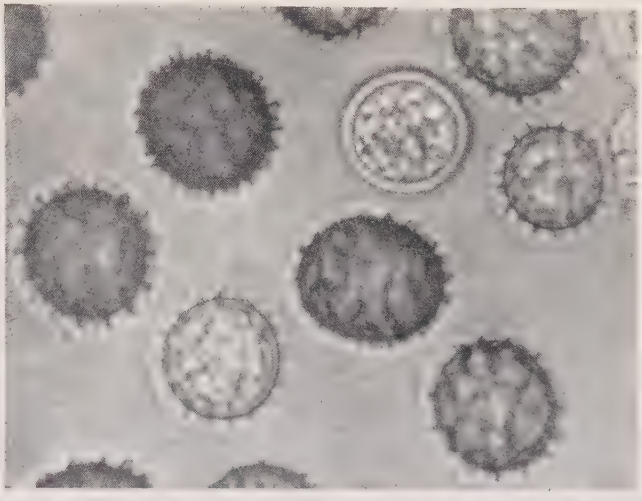


Abb. 2. Hyaline Spore mit doppelter Wandung (rechts oberhalb der Mitte) (1000fach vergrößert)

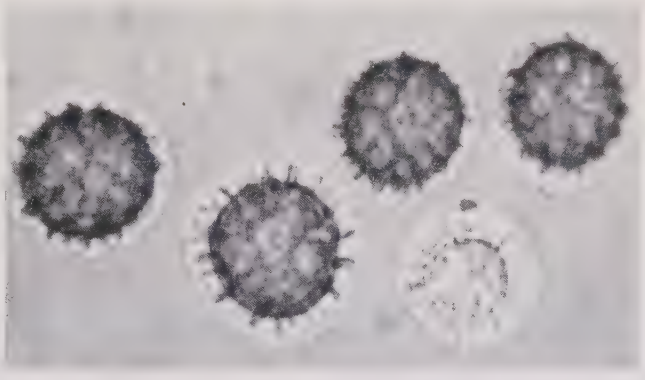


Abb. 3. Hyaline Spore mit starker Netzung mit gewöhnlichen Zwergsteinbrandsporen (1000fach vergrößert)

Um die Sporen, sowohl die typischen als auch die hyalinen, ist mehr oder weniger deutlich ein heller Hof festzustellen, der sich beim Einbringen der Sporen in verdünnte Tusche oder Nigrosin besonders deutlich abhebt. Dies deutet darauf hin, daß es sich um eine Schleimschicht handelt. Auf den Abb. 2 und 3 ist die Schicht besonders klar zu sehen.

2. Sporengröße

Young (53) gibt die Größe der Zwergsteinbrandsporen mit 13 bis 18 $\mu$ an. In eigenen variationsstatistischen Untersuchungen an je 200 *T. tritici-*

Sporen (Herkunft Weißenstein, Kreis Göppingen, 1948) und Zwergsteinbrandsporen (Herkunft Lützelalb, Kreis Göppingen, 1948) zeigte es sich, wie auf Abb. 4 zu sehen ist, daß die letzteren nur unbedeutend größer sind als die ersteren. Für die Sporen der normalen *T. tritici* wurde eine durchschnittliche Größe von 0,0179 mm ± 0,00025 mm, für die Zwergsteinbrandsporen eine solche von 0,0182 mm ± 0,00029 mm gefunden. Die Mittelwerte liegen innerhalb der dreifachen mittleren Fehlergrenze.

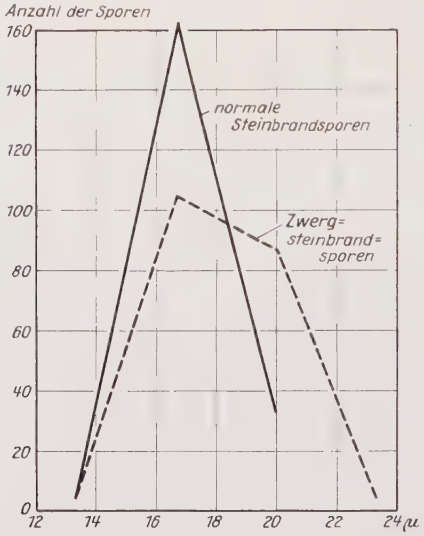



Abb. 4. Vergleich der Größe von Zwergsteinbrandsporen zu normalen Steinbrandsporen

Durchschnittliche Größe der Zwergsteinbrandsporen: 18,2 µ (mittl. Fehler: 0,284)

Durchschnittliche Größe der normalen Zwergsteinbrandsporen: 17,86 µ (mittl. Fehler: 0,250)

Variationskurven der Größe bei Zwergsteinbrandsporen (- - - - - - -) und normalen Steinbrandsporen (————)

Abszisse: Größe in µ
Ordinate: Anzahl der Sporen

### 3. Sporenfarbe

Die Färbung der einzelnen Zwergsteinbrandsporen in den Jahren 1947 und 1949 war kaum von derjenigen der *T. tritici*-Sporen zu unterscheiden. Sie war dunkelbraun bis schwärzlich. Dagegen war ihre Färbung im Jahre 1948 deutlich heller, ja als hellbraun zu bezeichnen. Ein Grund für diese Farbänderung konnte nicht festgestellt werden.

### 4. Brandbutten

Nach YOUNG (53) sind die Brandbutten des „dwarf bunt" hart und fest, nach HOLTON und HEALD (19) hart, aber leicht zu zerdrücken, so daß letztere darauf schließen, daß der Ölgehalt dieser Sporen geringer als der anderer Rassen ist. HOLTON und HEALD (23) schildern die Brandbutten als klein und rund. Auch WAGNER (49) stellt fest, daß die Brandbutten der verzwergten Pflanzen kleiner als die in normalen Steinbrandähren sind. Er fand die Mehrzahl der Butten im Innern mit leichtzerstäubendem Pulver, vielfach aber auch das Brandpulver von größerer Festigkeit. In diesem Falle erschien die Sporenmasse wie verklebt und zerfiel beim Zerdrücken in kleine Bruchstücke.

Es wurden variationsstatistische Messungen über die Buttengröße an je 50 Butten von gewöhnlichem Steinbrand und von Zwergsteinbrand durchgeführt. Die Butten stammten aus dem Jahre 1949 von der Sorte Heges

Basalt auf dem Versuchsfeld Waldhausen, Kreis Ulm. Die Maße der Zwergsteinbrandbutten betrugen im Durchschnitt 3,3 mm × 3,2 mm, während die der normalen Steinbrandbutten gleicher Sorte und Herkunft 4,8 mm × 3,6 mm ergaben. Der Größenunterschied war also recht beachtlich. Eine

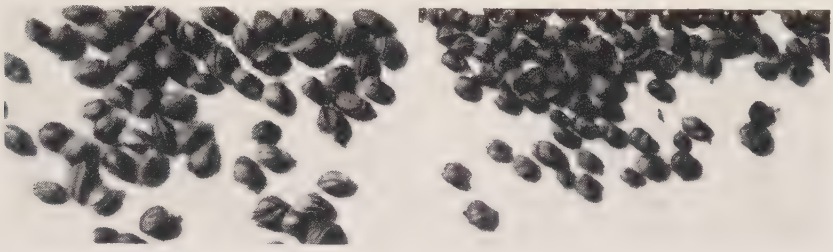


Abb. 5. Brandbutten von *Tilletia tritici* (links) und von Zwergsteinbrand (rechts) auf der gleichen Weizensorte

Wägung von je 100 Brandbutten von gewöhnlichen und Zwergsteinbrandbutten derselben Herkunft ergab bei den gewöhnlichen Sporen ein Gewicht von 1,950 g, bei den Zwergsteinbrandsporen aber nur ein solches von 1,050 g. Feucht (9) fand, daß bei *Tilletia tritici* und *Tilletia foetens* keine arteigene Brandbuttenform ausgebildet wird, sondern stellte fest, daß sich die Form der Brandbutten nach der sortentypischen Größe des Weizenkorns richtet. Auch vom Zwergsteinbrand ist nach den mannigfaltigen Erscheinungsformen der Brandbutten anzunehmen, daß sich diese vor allem nach der Wirtspflanze richten und so mehr eine Sorteneigentümlichkeit darstellen. Wie Abb. 5 zeigt, sind auf der gleichen Wirtssorte im Gegensatz zu den Brandbutten von *Tilletia tritici*, die länglicher und prall sind, die Zwergsteinbrandbutten rundlicher, gedrungener und unregelmäßig eingebuchtet.

Im Jahre 1948 waren die Zwergsteinbrandbutten von einer spröden, leicht brechenden Außenwand umgeben, während die Brandbutten von *T. tritici* von einer festen Schale umgeben waren.

Der Butteninhalt zeigte im Jahre 1947 dieselben Eigenschaften, wie sie Young oben beschrieb; er war hart und wie verklebt. Dagegen war die Sporenmasse 1948 und 1949 zwar hart, aber doch leicht zu zerdrücken.

### 5. Verzwergung der Pflanzen

Als das hervorstechendste Merkmal des Zwergsteinbrands wird von Young (53), Holton (19) und Wagner (49) die Verzwergung der Pflanzen angesprochen.

Eine Verkürzung des Halmes bei gewöhnlichem Steinbrand, allerdings nur um 7 cm, hatte schon Tillet (45) festgestellt. Erheblich stärkere Wuchsminderung beobachtet von Kirchner (25) mit 28,71 cm und Lang (30) mit 45 cm im Durchschnitt. Doch liegt trotz der starken Halmverkürzung in beiden Fällen kein Zwergsteinbrandbefall vor, da die Halmlänge der kranken Steinbrandpflanzen immer noch über 90 cm betrug. Zillig (54), Aamodt u. a. (1) und Knorr (26) weisen übereinstimmend darauf hin, daß auch

Pflanzen mit gesunden Ähren von infizierten Parzellen Wuchsverkürzung zeigen, woraus sie schließen, daß der Pilz offenbar auch in diese Pflanzen eingedrungen war, aber durch Einflüsse verschiedenster Art nicht zur Sporenbildung kam. Aus dieser Tatsache ergibt sich die Frage, wie die Verkürzung der Halmlänge überhaupt zustande kommt. LANG (30) vermutet, daß der „Abbau der Hyphen" irgendwie chemisch auf die Pflanze einwirkt. Doch ist das Problem dadurch nicht restlos geklärt. KOUDELKA (27) erhielt bei Infektionen von Roggen mit *Ustilago Tragopogonis* und *U. Scorzonerae* auch eine Verzwergung, die wohl durch ähnliche Faktoren hervorgerufen wurde wie beim Zwergsteinbrand.

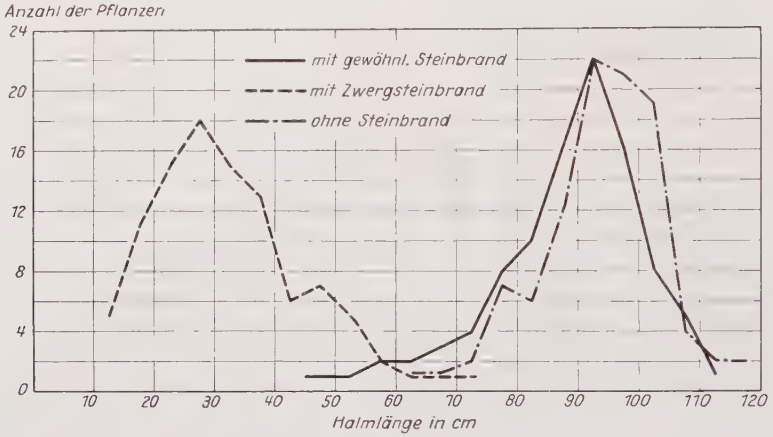



Abb. 6. Vergleich der Halmlänge von mit Zwergsteinbrand befallenen, mit gewöhnlichem Steinbrand befallenen und von gesunden Weizenpflanzen Variationskurven der Halmlänge bei Befall mit gewöhnlichem Steinbrand (————), mit Zwergsteinbrand (- - - - - -) und ohne Steinbrandbefall (-·-·-·-·-). Abszisse: Halmlänge in cm. Ordinate: Anzahl der Pflanzen

Messungen von 480 Zwergsteinbrandhalmen und 382 Halmen gleicher Sorte, die von gewöhnlichem Steinbrand befallen waren, ergaben einen klaren Unterschied zwischen der Länge der *T. tritici*-Halme und der der Zwergsteinbrandhalme. Abb. 6 zeigt das Ergebnis der Untersuchungen. Die Werte sind zum besseren Vergleich auf 100 umgerechnet. Die durchschnittliche Halmlänge der zur Kontrolle gemessenen 132 gesunden Halme betrug 92,15 cm ± 0,596 cm und die der zwergsteinbrandkranken 31,60 cm ± 0,671 cm. Die Kurven der gewöhnlichen steinbrandkranken und zwergsteinbrandkranken Halme überschneiden sich, so daß eine klare Abgrenzung beider Formen nach der Länge der Halme nicht möglich ist.

Die geringste gemessene Länge einer Zwergsteinbrandpflanze war 9 cm, die größte 74 cm. Da die von *T. tritici* kranken Halme auf der anderen Seite bis zu einer Höhe von 40 cm herunterreichen, ist eine sichere Trennung der gewöhnlichen von den Zwergsteinbrandpflanzen nur durch die mikroskopische Sporenuntersuchung jeder einzelnen Ähre gewährleistet. Die niedrigsten Halme zeigten sich bei den stark bestockten Pflanzen, während die

höheren zwergsteinbrandkranken Halme nur bei den schwächer bestockten Pflanzen auftraten.

Interessant ist schließlich noch das Ergebnis einer Untersuchung von FITTSCHEN (10) in Halle. Er erreichte bei der Mehrzahl der mit einer Steinbrand-Linie K (Herkunft Zürich) infizierten Sommerweizensorten geradezu eine Verzwergung der befallenen Pflanzen. Mit dem Zwergwuchs zusammen zeigte sich eine äußerst starke Bestockung. Die Ähnlichkeit mit den Symptomen des Zwergsteinbrands ist hier unverkennbar. Doch ist ein wesentlicher Unterschied in der Infektionsart festzustellen, da FITTSCHEN (10) die Verzwergung auf Grund von künstlicher Korninfektion erreichte, während diese, wie weiter unten noch zu erläutern sein wird, beim Zwergsteinbrand versagt. Außerdem hat FITTSCHEN seine Versuche an Sommerweizen durchgeführt, der bisher bei Frühjahrsaussaat von Zwergsteinbrand nicht befallen wurde. Leider sind die Versuche in Halle nicht fortgeführt worden.

Die Ähren an den verzwergten Pflanzen sind zum größten Teil voll ausgebildet. Daher ist die verzwergte Pflanze mit normaler Spindellänge der Ähren typisch für den Zwergsteinbrand.

### 6. Bestockung

Zur vollständigen Charakterisierung des Zwergsteinbrands gehört noch die außerordentlich starke Bestockung. Sie wird von YOUNG (53), HOLTON (19) und WAGNER (49) ausdrücklich betont. Sie ist ein wesentliches morphologisches Kennzeichen der Krankheit. Allerdings wird später noch darauf hinzuweisen sein, daß dieses Merkmal sehr stark von äußeren Faktoren abhängig ist. Bei dem für die Messungen der Halmlänge im Jahre 1948 bei Heges Basalt durchgeführten Versuche wurde gleichzeitig auch die Stärke der Bestockung untersucht. Es wurden eine Pflanze mit 15 Halmen, eine mit 14 Halmen und zwei mit 12 Halmen gefunden. Die durchschnittliche Bestokkungsstärke aller 96 untersuchten Zwergsteinbrandpflanzen betrug 6,7 Halme pro Pflanze. FITTSCHEN (10) stellte bei seinen oben erwähnten, mit der Linie K infizierten Pflanzen eine durchschnittliche Bestockungsstärke von 5,84 Halmen je Pflanze fest, was auf eine große Ähnlichkeit mit dem Zwergsteinbrand in dieser Hinsicht schließen läßt.

### 7. Teilbefall

Der Teilbefall einer Pflanze ist eine Erscheinung, die auch vom gewöhnlichen Steinbrand bekannt ist .Es ist aber auffällig, in welch starkem Ausmaß sie beim Zwergsteinbrand auftritt. Im Jahr 1948 waren an 35,21 % von 96 untersuchten befallenen Pflanzen ein bis drei gesunde Ähren festzustellen. Abb. 7 zeigt eine Pflanze mit Teilbefall. Als Grund für den Teilbefall beim gewöhnlichen Steinbrand gibt FITTSCHEN (10) die Tatsache an, daß

Abb. 7. Zwergsteinbrandpflanze mit Teilbefall

teilkranke Pflanzen immer stärker bestockt sind. Bei den stärker bestockten Pflanzen verbrandete der Steinbrand wohl die Nachschosser oder späteren Nebenhalme, aber nicht den Haupthalm. Er begründet dies damit, daß entweder die Sorten eine gewisse Resistenz besitzen oder das Pilzmyzel nicht in die zuerst gebildeten Halme und Ähren gedrungen ist. Auch andere Gründe sind seiner Meinung nach noch denkbar, so z. B. eine stark veränderte Zellsaftkonzentration in der Samenanlage der weiter in der Vegetation fortgeschrittenen Halme, die ein Eindringen des Pilzmyzels unmöglich macht.

Welche Erklärung für den Zwergsteinbrand anzuwenden ist, muß dahingestellt bleiben. Doch ist es durchaus wahrscheinlich, daß das verhältnismäßig spät eingedrungene Pilzmyzel die ersten Halme nicht mehr infizieren kann, da es sich, wie weiter unten noch näher erläutert wird, beim Zwergsteinbrand um eine Bodeninfektion handelt.

## II. Systematische Einreihung des Zwergsteinbrands

WAGNER (49) äußert sich zur systematischen Einreihung des Zwergsteinbrands dahin, daß er für eine Einstufung als eine besondere Unterform von *T. tritici* mit dem Namen *T. tritici nanifica* eintritt. Er meint, daß eine Einreihung nur als physiologische Rasse im Hinblick auf die starken morphologischen Veränderungen des Wirts, die unterschiedliche Brandbuttengröße und Sporenform, die keimphysiologischen Besonderheiten sowie die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens verschiedener Zwergsteinbrandrassen zu eng begrenzt sei.

In der amerikanischen Literatur wird der Zwergsteinbrand als „new variety of *T. tritici*" bezeichnet (YOUNG [53]). HOLTON (20) spricht von einer besonderen Rasse von *T. tritici*, während RODENHISER und HOLTON (41) 1945 schon sagen, daß die Einreihung des Zwergsteinbrands unter die gewöhnlichen Steinbrand erregenden Rassen von *T. tritici* nur vorläufig geschieht, bis Methoden zu vergleichender Pathogenitätsprüfung angegeben werden. HOLTON und HEALD (23) betonen auch, daß Pathogenitätsunterschiede die ursprünglichen Grundlagen der Rassentrennung der Tilletia-Arten waren und weiterhin auch die erste Grundlage hierfür bleiben werden. Nach GASSNER sind aber gegen eine Klassifikation auf Grund physiologischer Merkmale Bedenken zu erheben.

Auf Grund der vorliegenden Untersuchungen ist es wohl nicht mehr zu vertreten, den Zwergsteinbrand lediglich als eine Rasse von *T. tritici* anzusehen. Sämtliche anderen Rassen von *T. tritici* unterscheiden sich nicht in der Keimungsphysiologie, während der Zwergsteinbrand doch hier einige grundlegende Unterschiede aufzuweisen hat. Es ist zunächst mit den bei *T. tritici* üblichen Methoden, weder in Lösungen noch auf festen Substraten, ohne Zwischenbehandlung eine Keimung zu erzielen. Die auf schwierigen Umwegen gelungene Keimung bei HOLTON zeigt ein wesentlich verschiedenes Bild von der Keimung bei *T. tritici*. Vor allem ist hervorzuheben, daß die H-förmigen Fusionssporen nur selten sekundäre Sporen wie bei *T. tritici* hervorbringen. Statt dessen wächst direkt ein Myzel aus, welches wahrschein-

lich bereits das Infektionsmyzel ist. Dagegen zeigten die hyalinen Sporen bei der Keimung häufig sekundäre Sporen. Schon HOLTON (21) meint, daß diese Art der Keimung eventuell für die Klassifizierung des Zwergsteinbrandpilzes eine Rolle spielen wird.

Wie schon oben betont, sind nach HOLTON und HEALD Pathogenitätsunterschiede vor allem für die Klassifikation maßgebend. Bisher aber sind Impfungsversuche mit einzelnen Linien der hyalinen Sporen, die zunächst überhaupt nur für solche Versuche in Frage kamen, ohne Infektionserfolg geblieben. Ein positives Ergebnis wurde erst bei Beimpfung mit zwei Kombinationen von zehn monosporidialen Linien erreicht. Es wurde typischer Zwergsteinbrand mit den charakteristischen Sporen erzielt, von denen aber wieder nur die hyalinen keimten. Pathogenitätsuntersuchungen mit gewöhnlichen Zwergsteinbrandsporen konnten noch nicht durchgeführt werden.

Folgende z. T. erst später in dieser Arbeit erörterten Unterschiede zwischen *T. tritici* und Zwergsteinbrandsporen konnten gefunden werden:

1. Die Netzleisten an der Sporenwand der Zwergsteinbrandsporen sind höher als bei den Tilletia-Sporen.
2. Die Zwergsteinbrandsporen sind von einer Schicht, wahrscheinlich einer Schleimschicht, umgeben.
3. Neben den normalen Zwergsteinbrandsporen treten in größerer Anzahl sogenannte hyaline Sporen auf.
4. Die Zwergsteinbrandbutten sind erheblich kleiner als die Brandbutten von *Tilletia tritici*.
5. Die Halme der Zwergsteinbrandpflanzen sind stark verzwergt. In vielen Fällen sind lediglich die Halme, nicht aber die Ährenspindeln verkürzt, zumindest ist die Verkürzung der Halme viel stärker als die der Ährenspindeln.
6. Die Bestockung der verzwergten Pflanzen ist viel stärker als die der gewöhnlichen Steinbrandpflanzen.
7. Teilbefall tritt bei Zwergsteinbrandbefall öfter als bei gewöhnlichem Steinbrand auf.
8. Durch künstliche Saatgutinfektion konnte keine Erkrankung mit Zwergsteinbrand erzielt werden.
9. Nach HOLTON (20) bildete sich an Stelle der Sekundärsporidien bei der Keimung der Zwergsteinbrandsporen meist gleich ein Mycel, wahrscheinlich das Infektionsmycel, während relativ wenige sichelförmige sekundäre Sporidien entwickelt werden.
10. Die Keimung der Zwergsteinbrandsporen auf künstlichem Wege ist mit den Methoden, die bei *Tilletia tritici* angewandt werden, nicht zu erreichen.
11. Eine unmittelbare Übertragung durch das Saatgut ist in meinen Versuchen und Beobachtungen beim Zwergsteinbrand nicht festgestellt worden.
12. Die bisher üblichen Beizmittel versagen in der Bekämpfung des Zwergsteinbrandes.
13. Sommerweizen zeigt keinen Zwergsteinbrandbefall.
14. Es handelt sich bei der Infektion des Zwergsteinbrands um eine Bodeninfektion.
15. Der Zwergsteinbrand verträgt ein saures Medium besser als der gewöhnliche Steinbrand.

Auf Grund dieser zahlreichen Unterschiede wäre eine Klassifikation nicht nur als Unterform von *T. tritici*, sondern vielleicht besser als eine eigene Art angebracht. Der Stand der Untersuchungen läßt eine systematische Einordnung des Kurzsteinbrands aber noch verfrüht erscheinen.

## C. Physiologie

### a) Wirtspflanzenkreis

Zu den Wirtspflanzen gehört zunächst der Weizen, der auch durch den gewöhnlichen Steinbrand *Tilletia tritici* und *T. foetens* hauptsächlich befallen wird. Daneben wird im württembergischen Gebiet der Dinkel oder Spelz *(triticum spelta)* befallen, der auf der Hochfläche der Alb wegen seiner Winterfestigkeit heute noch eine nicht zu ersetzende Stellung einnimmt. Schließlich war im starken Befallsjahr 1948 vereinzelt auch der Roggen erkrankt. Es wurden in Lützelalb (Kreis Göppingen) und bei Merklingen (Kreis Ulm) zwergsteinbrandkranke Roggenpflanzen gefunden. Bei der mikroskopischen Untersuchung waren die Sporen mit Sicherheit als solche des Zwergsteinbrands zu erkennen. Es handelte sich also nicht um eine verkümmerte Form von *T. secalis* (Corda) Kühn. Die Verzwergung war eindeutig, wie aus der Abb. 8 hervorgeht. Dagegen konnte eine stärkere Bestockung bei Roggen in keinem Fall festgestellt werden. Teilbefall hingegen war fast bei jeder kranken Pflanze zu beobachten.

Abb. 8. Von Zwergsteinbrand befallener Roggen

Bei dem von PICHLER (33) beschriebenen Roggensteinbrand, der in den Infektionsverhältnissen und in der Unempfindlichkeit gegen die Universalbeizmittel dem Zwergsteinbrand sehr ähnelt, handelt es sich aber offenbar nicht um dieselbe Erscheinung wie auf der Alb. Die Verzwergung fehlt, und eine vergleichende Untersuchung der Netzleisten zeigte, daß diese beim Roggensteinbrand erheblich kleiner sind als beim Zwergsteinbrand.

Der Befall von Roggen ist deshalb von besonderer Bedeutung, weil Roggen nach APPEL und GASSNER (2) und nach VOLKART (48) verhältnismäßig schwer für Steinbrand empfindlich ist, da er zeitiger gesät wird und in dem noch warmen Boden schneller keimt und somit schwerer dem Brandpilz zum Opfer fällt.

### b) Keimverhältnisse

Das Kernproblem in der Erforschung des Zwergsteinbrandpilzes stellt die Keimung dar. Es ist daher verständlich, daß sich alle Forscher in USA und Deutschland zunächst der Lösung dieser Frage zuwandten.

#### 1. Frühere Untersuchungen

In Amerika befaßte sich vor allem HOLTON (19, 20, 23) mit der Keimung der Zwergsteinbrandsporen. Er wendete zunächst folgende Methoden für die Keimversuche bei den Sporen an:

Abwechslungsweises Ausfrierenlassen und Wiederauftauen; Feuchtigkeit im Wechsel mit Trockenheit; verschieden lange Wärmebehandlung bei 35 ° und Behandlung mit „Auxilin" (Indolyl-Buttersäure). Die Versuche wurden angesetzt auf Kartoffel-Dextrose-Agar, auf Wasseragar, Bodenextraktagar aus frischer oder trocken sterilisierter Erde und Extrakten verschiedener Varietäten von Winterweizen. Wasseragar, auf dem Weizenkeimlinge wuchsen, und Wasseragar, auf dem Sporen anderer Rassen von *Tilletia tritici* und *Tilletia foetens* keimten, wurden auch geprüft. Ferner wurden Sporen auf die Oberfläche sterilisierter und frischer, feuchtgehaltener Erde gebracht. Die Temperaturen bewegten sich zwischen 10 und 25 °, einige Versuche wurden bei 35 ° angesetzt. Keine dieser Methoden führte aber zum Ziele. Lediglich die bereits erwähnten hyalinen Sporen keimten manchmal. Neben einigen selteneren Keimungsbildern war der häufigste Typus die Bildung eines kurzen, sterigmenähnlichen Gebildes, an dessen Spitze eine runde Zelle entstand, die normalerweise leer war. Sie schrumpfte oder platzte bald und spritzte Cytoplasmateile aus. In einigen Fällen bildeten sich kurze Sterigmen oder lange promycelähnliche Hyphen, an deren Spitze sich sichelförmige oder kurze zylinderförmige Sporidien bildeten. Die abgeschleuderten Sporidien wurden auf Kartoffel-Dextrose-Agar kultiviert, wo die Sporidien in zweierlei Art zum Wachstum kamen, als haploider Myceltyp mit raschem Wachstum und starker Verzweigung oder als Hyphen, die offenbar zweikernig waren und ein langes septiertes Mycel erzeugten. Infektion wurde nur erreicht bei Beimpfung mit zwei Kombinationen von zehn monosporidialen Linien. Es wurde typischer Zwergbrand mit den charakteristischen Sporen erzielt, von denen aber wieder nur die hyalinen keimten. Bei Infektionsversuchen mit beimpfter Saat oder infiziertem Boden wurden bis auf wenige Ausnahmen, die vielleicht auf keimende hyaline Sporen zurückgehen, keine Erfolge erzielt. Holton (19) erwägt die Möglichkeit, ob etwa auch die natürliche Infektion nur mit Hilfe der hyalinen Sporen vor sich gehe, kommt aber auf Grund ihrer geringen Anzahl, der geringen Keimfähigkeit und der anscheinend eingeschlechtlichen Natur zu der Überzeugung, daß dies wohl fraglich sei. Bei Bastardisierungsversuchen mit *Tilletia tritici* und *Tilletia foetens* zeigte es sich, daß die Erbfaktoren für die charakteristische Sporenbildung und für den Zwergwuchs besonders vererbt werden.

Nach vergeblichen Versuchen des Jahres 1941, in denen nur vereinzelte hyaline Sporen zum Keimen kamen, gelang es Holton dann im Jahre 1943 (20), eine Keimung der normalen Zwergsteinbrandsporen selbst zu erzielen. Die Sporen wurden 1 bis 7 Monate in destilliertem Wasser gewässert und dabei bei einer Temperatur von 4 ° C aufbewahrt.

Die Keimversuche Holtons wurden auf 2 %igem Wasseragar angesetzt und bis zu zwei Monaten lang Temperaturen von 5, 10 oder 20 ° C ausgesetzt. Die erzielten Keimprozente schwankten zwischen spurenweiser und 30 %iger Keimung, wobei die höchste Prozentzahl bei 10 ° C erreicht wurde. Das von den keimenden Sporen erzeugte Promycel hatte meist zwei bis vier Verzweigungen. Aus jedem Ast entstanden zwei bis acht Kranzkörper, von denen wieder einige paarweise fusionierten, wie es von *Tilletia tritici* her bekannt ist. Ein Sporenpaar erzeugte aber nun keine Sekundärsporidien, sondern gewöhnlich ein Mycel, das als Infektionsmycel angesprochen wird. Nur wenige sichelförmige Sekundärsporidien wurden entwickelt. Bei gewissen Serien wuchs der Keimungsprozentsatz mit der Dauer des Wässerungsprozesses, dagegen schienen Zahl und Grad der Verzweigung des Promycels bei Sporen, die länger als fünf Monate gewässert waren, zurückzugehen.

Leider sind Bestätigungen dieser Keimungsmethode nicht mehr veröffentlicht worden, so daß zu befürchten ist, daß sie nicht reproduzierbar war.

Auf Grund der amerikanischen Versuchsergebnisse wurden auch von Wagner (49) und anderen Versuchsanstellern die verschiedensten Methoden durchgeprüft, um die Sporenkeimungen zu erreichen. Bisher haben sie noch keine Erfolge erzielen können.

2. Eigene Versuchsergebnisse

Ende des Jahres 1947 wurde mit eigenen Versuchen begonnen, um die Sporenkeimung beim Zwergsteinbrand zu erreichen. Da mir zu dieser Zeit die Keimversuche von HOLTON (19, 20, 23) noch nicht bekannt waren, wurde vor allem auf den Erfahrungen,die RIEHM (39), HAHNE (14) und RABIEN (35) in umfangreichen Sporenkeimversuchen mit gewöhnlichem Steinbrand gesammelt hatten, aufgebaut.

Insgesamt wurden 133 Keimversuche durchgeführt. Zunächst wurden sämtliche Methoden, welche die gewöhnlichen Steinbrandsporen zum Keimen bringen, ohne Ergebnis beim Zwergsteinbrand angewandt. Auf Grund der HOLTONschen Versuche (20), der nach ein- bis siebenmonatiger Wässerung bis zu 30 %ige Keimungen erreichen konnte, wurden auch Sporen gewässert und in Abständen untersucht, doch konnten Keimungen nur sporadisch festgestellt werden, die aber dann auch keine Kranzkörperchen bildeten. Zwergsteinbrandsporen in Weizenkeimlingsextrakt und an junge Weizenkeimlinge auf die verschiedenste Weise herangebracht, keimten nicht.

Da Wirtschaftsdünger nach den Untersuchungen des Jahres 1948 einen starken Einfluß auf den Zwergsteinbrand gezeigt hat, wurden auch Versuche mit Extrakten von verrottetem Stallmist und Jauche durchgeführt. Lediglich in letzterer wurden drei normale Keimungen beobachtet, die sich aber nicht über den Keimschlauch hinaus entwickelten. Weitere Versuche mit verdünnter Jauche und Zusatz von Calciumnitrat zur Jauche ergaben keine regulären Keimungen.

Schließlich wurden auch Versuche in verschieden stark sauren Medien angelegt, da Zwergsteinbrand auf sauren Böden stärker auftrat; doch war auch bei diesen Versuchen das Ergebnis negativ.

Alle Laborversuche, die zur Erforschung der Keimungsvorgänge durchgeführt wurden, brachten keine befriedigenden Ergebnisse.

### c) Infektion

1. Eigene Untersuchungen zur Feststellung des Infektionsvorganges

Da eine sichere Methode, die Sporen des Zwergsteinbrands zum Keimen zu bringen, bisher noch nicht gefunden ist, fehlen auch experimentelle Wege, um den Vorgang der Infektion zu ergründen. Schon bei dem sehr eingehend durchforschten Weizensteinbrand sind bisher nur dürftige Erkenntnisse über den Infektionsvorgang gewonnen worden (BREFELD 6, KÜHN 28, 29, VON KIRCHNER 25). Selbst LANG (30) kann trotz seiner genauen Untersuchung den Weg des Pilzes in die Samenanlage nicht mehr feststellen.

Die selbst angestellten Versuche, dem Infektionsvorgang beim Zwergsteinbrand näher zu kommen, mußten negativ sein, da die Krankheit trotz stärkster Saatgut- und Bodeninfektion mit Zwergsteinbrandsporen in der Parzelle, aus der die Versuchspflanzen entnommen wurden, ausblieb.

2. Versuche mit Saatgutübertragung

Da auf den bisherigen Wegen kein klares Bild über den Infektionsvorgang zu erreichen war, mußte dessen Klärung daher auf andere Weise ver-

*Tabelle 1*

Wirkung von Quecksilber- und Formaldehydbeize auf den Zwergsteinbrand

Beizwirkungsversuch

angelegt am 8. Oktober 1947 auf dem Christophshof

Sorte: Heges Basalt Z = mit Zwergsteinbrandsporen infiziert G = mit gewöhnlichen Steinbrandsporen infiziert

| Lfd. Nr. | Behandlung | Wiederholung | Zahl der Ähren: gesund | gesund Mittel aus a—c | vom gewöhnlichen Steinbrand befallen | vom gewöhnlichen Steinbrand befallen Mittel aus a—c | vom Zwergsteinbrand befallen | vom Zwergsteinbrand befallen Mittel aus a—c |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | unbehandelt nicht infiziert | a | 446 | | 26 | | 6 | |
| | | b | 423 | 473,3 | 15 | 21,0 | 4 | 7,3 |
| | | c | 551 | | 22 | | 12 | |
| 2 | unbehandelt Z | a | 471 | | 61 | | 14 | |
| | | b | 775 | 643,3 | 98 | 65,3 | 5 | 6,3 |
| | | c | 684 | | 37 | | — | |
| 3 | unbehandelt G | a | 632 | | 321 | | — | |
| | | b | 811 | 722,3 | 381 | 297,0 | — | 3,3 |
| | | c | 724 | | 189 | | 10 | |
| 4 | Ceresan trock. 150 g / 100 kg Z | a | 714 | | 2 | | 12 | |
| | | b | 666 | 711,3 | 3 | 1,7 | 21 | 15,0 |
| | | c | 754 | | — | | 12 | |
| 5 | Ceresan trock. 200 g / 100 kg Z | a | 514 | | — | | 3 | |
| | | b | 643 | 629,7 | — | 3,3 | — | 3,7 |
| | | c | 732 | | 10 | | 8 | |
| 6 | Ceresan trock. 150 g / 100 kg G | a | 578 | | 24 | | 5 | |
| | | b | 767 | 646,0 | 17 | 13,7 | 14 | 8,0 |
| | | c | 593 | | — | | 5 | |
| 7 | Ceresan trock. 200 g / 100 kg G | a | 622 | | 34 | | 4 | |
| | | b | 646 | 697,3 | 6 | 23,3 | 11 | 14,3 |
| | | c | 824 | | 30 | | 28 | |
| 8 | Ceresan naß tauchen 0,1 % Z | a | 844 | | — | | 5 | |
| | | b | 689 | 753,7 | — | 1,0 | — | 8,7 |
| | | c | 728 | | 3 | | 21 | |
| 9 | Ceresan naß benetzt 0,5 % Z | a | 709 | | — | | 20 | |
| | | b | 684 | 704,7 | 1 | 0,3 | 12 | 22,7 |
| | | c | 721 | | — | | 36 | |
| 10 | Ceresan kurz naß 2 % Z | a | 756 | | — | | 15 | |
| | | b | 688 | 732,0 | 3 | 2,3 | 26 | 18,3 |
| | | c | 752 | | 4 | | 14 | |
| 11 | Ceresan naß tauchen 0,1 % G | a | 716 | | 26 | | — | |
| | | b | 765 | 691,0 | 32 | 23,0 | — | 10,0 |
| | | c | 592 | | 11 | | 30 | |
| 12 | Ceresan naß benetz. 0,5 % G | a | 677 | | 2 | | 27 | |
| | | b | 669 | 651,7 | 10 | 4,7 | 3 | 10,0 |
| | | c | 609 | | 2 | | — | |
| 13 | Ceresan kurz naß 2 % G | a | 672 | | 10 | | 4 | |
| | | b | 751 | 711,3 | 10 | 12,0 | — | 5,3 |
| | | c | 711 | | 16 | | 12 | |
| 14 | Formalin tauch. 0,075 % G | a | 554 | | 6 | | — | |
| | | b | 640 | 566,3 | 1 | 2,3 | 15 | 5,0 |
| | | c | 505 | | — | | — | |
| 15 | Formalin benetz. 0,075 % G | a | 548 | | 4 | | 6 | |
| | | b | 725 | 625,7 | — | 1,7 | 16 | 21,0 |
| | | c | 604 | | 1 | | 41 | |
| 16 | Formalin tauch. 0,1 % G | a | 440 | | 1 | | — | |
| | | b | 545 | 475,0 | — | 3,7 | 4 | 9,0 |
| | | c | 440 | | 10 | | 23 | |
| 17 | Formalin benetz. 0,075 % G | a | 381 | | 9 | | 4 | |
| | | b | 518 | 505,7 | — | 3,0 | — | 1,3 |
| | | c | 618 | | — | | — | |

sucht werden. Einer der ersten Wege hierzu war die Untersuchung der Saatgutübertragung. Sämtlichen amerikanischen Forschern, die sich mit Zwergsteinbrand befaßten, wie BAMBERG u. a. (4), HOLTON (24) und YOUNG (53), ist die künstliche Saatgutinfektion nicht gelungen. FITTSCHEN (10) erzeugte mit seiner Linie K zwar auf dem Wege der künstlichen Saatinfektion stark bestockte Zwergpflanzen, doch sind die anderen charakteristischen Merkmale des Zwergsteinbrands an diesen Zwergpflanzen nicht vorhanden, wie bereits oben betont, so daß es sich hier kaum um den echten Zwergsteinbrand handeln kann. Dagegen berichtet WAGNER (50, 51) in drei Fällen im Jahre 1947/48 von einer geglückten Saatgutinfektion, die allerdings nur ganz geringen Befall (0,11 %, 0,21 %, 0,37 %) bewirkte. Im Jahre 1948/49 gelang ihm eine künstliche Saatgutinfektion aber nicht, so daß er daraus schließt, daß diese nur bei günstigen Keimverhältnissen möglich ist.

Um die Möglichkeit einer künstlichen Saatgutinfektion zu untersuchen, wurden im Jahre 1947/48 eingehende eigene Versuche durchgeführt. Dazu wurde Saatgut künstlich mit Zwergsteinbrandsporen infiziert (2 g auf 1 kg). Dieses wurde an zwei Stellen (Hohenheim und Ihinger Hof, Kreis Leonberg), wo der Boden als nicht zwergsteinbrandverseucht bekannt ist, und zum Vergleich an zwei Stellen (Lützelalb, Kreis Göppingen, und Christophshof bei Geislingen), die als zwergsteinbrandverseucht anzusehen sind, ausgesät. Weder in Hohenheim noch auf dem Ihinger Hof konnte eine Zwergsteinbrandpflanze festgestellt werden, obwohl es sich im Versuchsjahr 1948 um ein ausgeprägtes Zwergsteinbrandjahr handelte. Auf dem Christophshof war, wie Tabelle 1 zeigt, zwischen den mit Zwergsteinbrand infizierten und den unbehandelten oder mit gewöhnlichem Steinbrand infizierten Parzellen im Befall durch Zwergsteinbrand kein Unterschied zu beobachten. Der Versuch auf Lützelalb war ausgewintert.

Ein zweiter Versuch, der die Wirkung der künstlichen Infektion auf die verschiedenen Sorten im Zwergsteinbrandgebiet klären sollte, wurde im selben Jahr auf dem Messelhof bei Donzdorf durchgeführt. Trotz der künstlichen Infektion war der Befall auch in den infizierten Parzellen so schwach, daß der Versuch nicht ausgewertet werden konnte. Also war auch hier, trotz verseuchten Bodens, keine verstärkte Infektion durch künstliche Saatgutinfektion erfolgt.

Es wurden weiter im Jahre 1947/48 drei Versuche mit unbehandeltem und künstlich infiziertem Saatgut (Heges Basalt) auf zwei Gütern der Rechbergschen Domänendirektion, die im Zwergsteinbrandgebiet auf der Alb liegen, und auf einem Gut, das unterhalb der Alb im unverseuchten Gebiet liegt, angelegt (Tab. 2). Der Versuch auf dem Hof unterhalb der Alb zeigte weder in der unbehandelten noch in der infizierten Parzelle Zwergsteinbrand. Im Gegensatz dazu zeigten die beiden Albversuche wohl Zwergsteinbrandbefall, der aber vom verseuchten Boden herrührte und auftrat, ob das Saatgut mit Zwergsteinbrand infiziert war oder nicht.

Eine künstliche Saatgutinfektion auf Boden, der schon seit Menschengedenken Schafweide war, und daher keine Zwergsteinbrandsporen zeigen konnte, brachte ebenfalls keinen Befall.

Versuche mit künstlicher Saatgutinfektion wurden im Herbst 1947 und 1948 in Gefäßen mit Alberde angesetzt. In keinem der beiden Jahre trat in einem der Gefäße Zwergsteinbrand auf.

Da Wagner (50) seinen Befall nach künstlicher Infektion in Gartenerde erzielt hatte, und da auch Rabien (35) mit gewöhnlichen Steinbrandsporen im Kompost höchste Brandwerte erzielte, wurde eine Gefäßreihe mit bester Komposterde gefüllt und hierein infiziertes Saatgut eingesät. Auch hier wurde keine zwergsteinbrandkranke Pflanze gefunden.

*Tabelle 2*

Befall von mit Zwergsteinbrand infiziertem Saatgut auf verseuchtem und unverseuchtem Boden. 1948

| Lfd. Nr. | Ort | Saatgutbehandlung | Zahl der Ähren | |
|---|---|---|---|---|
| | | | gesund | von Zwergsteinbrand befallen |
| 1 | Messelhof auf der Alb (Boden verseucht) | unbehandelt | 500 | 0 |
| | | mit Zwergsteinbrandsporen infiziert | 412 | 2 |
| 2 | Oberweckerstell auf der Alb (Boden verseucht) | unbehandelt | 319 | 23 |
| | | mit Zwergsteinbrandsporen infiziert | 373 | 15 |
| 3 | Birkhof vor der Alb (Boden nicht verseucht) | unbehandelt | 356 | — |
| | | mit Zwergsteinbrandsporen infiziert | 319 | — |

Da in all diesen Versuchen eine künstliche Saatgutinfektion mit Zwergsteinbrandsporen nicht glückte, kann die Möglichkeit einer solchen unter normalen Bedingungen wohl abgelehnt werden.

### 3. Befallsverhältnisse beim Sommerweizen

Nach Holton und Suneson (24) befällt der Zwergsteinbrand nur Herbstsaaten, während der Sommerweizen befallsfrei bleibt. Bei eigenen zahlreichen Untersuchungen von Sommerweizenfeldern konnten ebenfalls in keinem Falle Zwergsteinbrandpflanzen gefunden werden. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die Infektion oder Entwicklung des Zwergsteinbrands von Faktoren beeinflußt wird, denen nur die Wintersaat ausgesetzt ist. Es könnte die niedrige Temperatur in den Wintermonaten eine wesentliche Rolle spielen. Entscheidender scheint aber die lange Ruhezeit des Weizens über den Herbst und Winter zu sein, die dem Pilz Gelegenheit gibt, in die Wirtspflanze einzudringen und sich wohl auch in ihr zu verbreiten. In der erheblich kürzeren Vegetationszeit und schnelleren Entwicklung des Sommerweizens ist ihm das offenbar nicht möglich. Daß es sich nicht um irgendwelche Sorteneigentümlichkeiten des Sommerweizens im Gegensatz zum Winterweizen handeln kann, zeigt die Tatsache, daß im Herbst gesäter Sommerweizen auch befallen wird (Young 53).

### 4. Versuche mit Bodeninfektion

Das Mißlingen sämtlicher Versuche, durch künstliche Saatgutbepuderung mit Sporen eine Infektion zu erreichen, legte den Gedanken nahe, daß es

sich beim Zwergsteinbrand um eine Bodeninfektion handeln müsse. In der amerikanischen Literatur wird diese Ansicht auch von YOUNG (53), BAMBERG u. a. (4), HOLTON und SUNESON (24) und RODENHISER und HOLTON (41) vertreten. Auch WAGNER (49) schreibt, daß die stärkste Infektion nach Einbringen der Sporen in den Boden zwei Tage vor der Aussaat erreicht wurde.

Zunächst wurden mehrere Versuche in Mitscherlich-Gefäßen angelegt. Der Boden wurde je Gefäß mit 1 ccm Sporen des Zwergsteinbrands versetzt. Weder im ersten Jahr noch bei einer Wiederholung der Einsaat ohne nochmalige Bodenverseuchung im folgenden Jahr konnte eine Infektion festgestellt werden. Lediglich bei einem Versuch, in dem geprüft werden sollte, ob nur in Albboden eine Infektion möglich sei, wurden in einem Gefäß mit künstlich infiziertem Albboden zwei kranke Ähren gefunden. Doch sind offenbar die Bedingungen für eine Infektion in Gefäßen zu ungünstig, als daß sie für entsprechende Versuche mit herangezogen werden könnten.

Anders war das Ergebnis von Freilandversuchen. Es wurden auf Lützelalb, Kreis Göppingen, im Zwergsteinbrandgebiet, sowie in unverseuchtem Gebiet in Hohenheim und auf dem Ihinger Hof, Kreis Leonberg, Versuche mit der Zielsetzung angelegt, durch Infektion des Bodens einen Zwergsteinbrandbefall zu erzeugen.

Der Versuch wurde auf folgende Art angelegt:

| | A | B | C |
|---|---|---|---|
| a | | | |
| b | | | |

Bodenbehandlung: A = unbehandelt
B = mit 1 g/qm Zwergsteinbrandsporen infiziert
C = mit 1 g/qm gewöhnlichen Steinbrandsporen infiziert.

Saatgutbehandlung: a = unbehandelt
b = mit 200 g/100 kg Ceresan gebeizt.

Es wurden jeweils drei Parzellen zu 3 qm in dreifacher Wiederholung unbehandelt gelassen. Weitere drei Parzellen wurden je Quadratmeter mit 1 g Zwergsteinbrandsporen und die letzten drei Parzellen mit 1 g gewöhnlichen Steinbrandsporen infiziert. Die Sporen wurden mit einem feinen Sieb auf die Parzelle ausgestreut und dann mit dem Saatgut eingeeggt. Zu der ersten Versuchsreihe blieb das Saatgut unbehandelt, in der zweiten wurde es mit 200 g/100 kg Ceresan gebeizt. Das Ergebnis zeigt Tabelle 3.

Da die Beizwirkung hier zunächst außer acht gelassen werden kann, ist festzustellen, daß in Lützelalb sowohl bei dem unbehandelten wie auch bei den mit gewöhnlichem Steinbrand infizierten Parzellen je in einer Parzelle Zwergsteinbrand auftrat, daß aber in dem mit Zwergsteinbrand infizierten Stück in fünf Parzellen zwergsteinbrandkranke Pflanzen festgestellt wurden. Es ist also hier die Ansicht von HOLTON und SUNESON (24), daß durch Zugabe von Zwergsteinbrandsporen zur Saatzeit in verseuchten Boden eine bessere Infektion erzielt wird, durchaus bestätigt.

In Hohenheim, das nicht zum Zwergsteinbrandgebiet gehört, waren in dem mit Zwergsteinbrandsporen verseuchten Teilstück in sechs Parzellen verzwergte Pflanzen festzustellen. Da bei der Aussaat der Sporen der Wind

*Tabelle 3*

Versuche mit Infektion des Bodens durch Zwergsteinbrandsporen und gewöhnliche Steinbrandsporen in Lützelalb, Hohenheim und Ihingen 1949

| Lfd. Nr. | Saatgut-Behandlung | Wiederholung | A | | | B | | | C | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | gesund | vom gew. Steinbr. befallen | vom Zwergsteinbr. befallen | gesund | vom gew. Steinbr. befallen | vom Zwergsteinbr. befallen | gesund | vom gew. Steinbr. befallen | vom Zwergsteinbr. befallen |
| | | | Lützelalb | | | | | | | | |
| 1 | unbehandelt | a | 523 | 3 | 0 | 585 | 24 | 17 | 457 | 133 | 0 |
| | | b | 677 | 4 | 0 | 574 | 12 | 0 | 458 | 169 | 0 |
| | | c | 651 | 15 | 0 | 611 | 13 | 3 | 431 | 97 | 0 |
| 2 | gebeizt | a | 649 | 0 | 7 | 539 | 0 | 1 | 463 | 65 | 0 |
| | Ceresan | b | x | 0 | 0 | 559 | 1 | 1 | 493 | 109 | 0 |
| | 200 g / 100 kg | c | 614 | 1 | 0 | 619 | 2 | 0 | 445 | 78 | 0 |
| | | | Hohenheim | | | | | | | | |
| 1 | unbehandelt | a | 674 | 24 | 0 | 619 | 5 | 3 | 574 | 117 | 1 |
| | | b | 654 | 28 | 0 | 669 | 27 | 1 | 477 | 216 | 0 |
| | | c | 683 | 0 | 0 | 654 | 24 | 0 | 514 | 185 | 0 |
| 2 | gebeizt | a | 630 | 32 | 0 | 686 | 0 | 2 | 556 | 158 | 0 |
| | Ceresan | b | 764 | 23 | 0 | 730 | 0 | 0 | 486 | 193 | 0 |
| | 200 g / 100 kg | c | 614 | 10 | 0 | 760 | 0 | 3 | 500 | 152 | 0 |
| | | | Ihinger Hof | | | | | | | | |
| 1 | unbehandelt | a | 962 | 49 | 0 | 857 | 172 | 0 | 825 | 116 | 0 |
| | | b | 947 | 30 | 0 | 799 | 77 | 0 | 743 | 242 | 0 |
| | | c | 813 | 32 | 0 | 964 | 30 | 0 | 736 | 234 | 0 |
| 2 | gebeizt | a | 956 | 2 | 0 | 941 | 23 | 0 | 788 | 102 | 0 |
| | Ceresan | b | 861 | 12 | 0 | 949 | 28 | 0 | 874 | 156 | 0 |
| | 200 g / 100 kg | c | 828 | 6 | 0 | 967 | 10 | 0 | 807 | 204 | 0 |

Bodenbehandlung: A = unbehandelt B = mit Zwergsteinbrandsporen infiziert 1 ccm/qm C = mit gewöhnlichen Steinbrandsporen infiziert 1 ccm/qm x = nicht ausgezählt, da kein Befall

Sorte: Heges Basalt

wehte, waren offenbar an den Rand der mit gewöhnlichem Steinbrand infizierten Nachbarparzelle noch Zwergsteinbrandsporen hingeweht worden, so daß in der an das zwergsteinbrandverseuchte Teilstück anschließenden, mit Tilletia-Sporen infizierten Parzelle auch noch eine Zwergsteinbrandähre gefunden wurde.

Auf dem Ihinger Hof blieben alle Versuchsparzellen befallsfrei. Doch wurden in einem weiteren Beizversuch mit neuen Beizmitteln auch hier auf mit Zwergsteinbrand verseuchtem Boden zwei kranke Ähren festgestellt.

Aus diesen Versuchen ist zu ersehen, daß wohl ein grundsätzlicher Unterschied in der Infektion vom Boden her zwischen *Tilletia tritici* und dem Zwergsteinbrand nicht besteht, da auch der gewöhnliche Steinbrand nach Verseuchung des Bodens mit Tilletiasporen sehr stark auftrat. So sind die Infektionsmöglichkeiten dieselben, nur ist *Tilletia tritici* sofort in der Lage zu infizieren, während der Zwergsteinbrand offenbar erst einer Lagerung im Boden bedarf, bis er keimfähig wird. Infolgedessen herrscht bei der in unserem Gebiet üblichen Fruchtfolge beim gewöhnlichen Steinbrand die

Keimlingsinfektion vor, während beim Zwergsteinbrand die Bodeninfektion im Vordergrund steht. Eine Verschleppungsmöglichkeit aus dem bisherigen Befallsgebiet auf der Alb besteht daher durchaus.

## D. Einwirkung verschiedener Faktoren auf den Zwergsteinbrand

### a) Einfluß von Lage und Boden

1. Lokale Verhältnisse

Bei der Betrachtung der äußeren Faktoren, die für das Auftreten des Zwergsteinbrands von Bedeutung sind, war zunächst die Einwirkung von Lage und Boden zu untersuchen. Die jeweiligen lokalen Verhältnisse wurden im Jahre 1948 sehr eingehend untersucht. Doch konnte keinerlei Zusammenhang mit dem Auftreten des Zwergsteinbrands festgestellt werden. Es blieb ohne Einfluß auf das Auftreten des Zwergsteinbrands und seine Stärke, ob das Feld in windgeschützter Lage gelegen war oder nicht, ob es nach einer bestimmten Himmelsrichtung geneigt war, ob es im Tal oder auf der Höhe lag. Diese Faktoren konnten also als unmaßgeblich ausgeschaltet werden.

2. Bodenverhältnisse

Da der Zwergsteinbrand durch Bodeninfektion übertragen wird, lag ein Einfluß des Bodens im Bereich der Möglichkeit. Zunächst wurde die Bodenart in ihrem Verhältnis zum Zwergsteinbrand untersucht. Es konnten jedoch keine Unterschiede bei den einzelnen Bodenarten beobachtet werden. Er trat genau so stark auf Feuersteinböden der Weißensteiner Alb, auf humosen Böden der Donzdorfer Alb oder vom leichten Lehmboden auf den Heidhöfen bei Böhmenkirch bis zu schwersten Lehmböden nördlich Ulm am Südabhang der Alb auf.

Es war aber festzustellen, daß der Befall auf den einzelnen Teilen eines Feldes sehr unterschiedlich sein konnte. Über den stärkeren Feldrandbefall wird später noch zu berichten sein. Aber auch im Feldinnern konnte man plötzlich auf eine stark befallene Stelle treffen, während mitunter im Umkreis von 30 bis 50 m alles gesund war. Die Vermutung, daß es sich um den Einfluß der sogenannten „Platten" handeln könnte, d. h. um sehr flachgründige Stellen mit darunterliegendem Fels, konnte nicht als stichhaltig gefunden werden; denn es gab Stellen, an denen auf solchen Platten kein Zwergsteinbrand zu beobachten war, während er auf anderen Platten wieder verhältnismäßig stark in Erscheinung trat.

Da das im Feldinnern beobachtete, teilweise starke Auftreten durch die Platten also nicht eindeutig zu klären war, mußten auch andere Faktoren daran beteiligt sein. Vor allem dürfte die Bodengüte hier eine Rolle spielen. Im Jahre 1948 konnten infolge des allgemein starken Auftretens des Zwergsteinbrands darüber keine Erfahrungen gesammelt werden. Dagegen ließ sich 1949 an mehreren Stellen feststellen, daß mit zunehmender Bodengüte auch der Zwergsteinbrand stärker wurde. Am charakteristischsten war eine Lage in Sontheim, Kreis Münsingen, wo der Boden langsam aus dem Tal ansteigend nach oben zu immer magerer wurde. Die dort liegenden

fünf Weizenfelder zeigten vom Tal, wo ein Befall bis 10 % festgestellt wurde, nach der Höhe zu über 7 und 6 % immer geringere Befallsprozente, bis das höchstgelegene Feld schließlich befallsfrei war. Nur einer der Äcker zeigte bereits in tieferer Lage keinen Befall, was aber auf die anomal späte Saatzeit zurückzuführen war. Mit einiger Wahrscheinlichkeit sind also besonders stark hervortretende Befallsstellen im Feldinnern in einzelnen Fällen auch mit besseren Nährstoff- und Humusverhältnissen im Boden in Zusammenhang zu bringen.

Untersuchungen über den Einfluß der Bodenstruktur auf die Befallsstärke waren nicht auszuwerten, da die Instrumente wegen des sehr steinigen Bodens nicht vorschriftsmäßig eingesetzt werden konnten.

So blieb noch die Rolle der Bodenreaktion zu untersuchen. Auf Grund von Bodenreaktionskarten wurde das Auftreten des Zwergsteinbrands im Jahre 1948 in Lützelalb und Ruppertstetten mit der jeweils festgestellten Reaktion des Bodens verglichen. Es wurde fast durchweg beobachtet, daß sich die Befallsherde auf sauren Böden befanden, und daß mit zunehmender Versauerung eine Verstärkung des Zwergsteinbrandbefalls Hand in Hand ging. Auf Lützelalb und Ruppertstetten waren die stärksten Befallszahlen auf Böden mit pH-Werten von 4,4 bis 5,0 festzustellen. Etwas schwächer war ein Boden mit pH 5,7 befallen.

Um diese Feststellung zu erhärten, wurde im Jahre 1949 auf 14 Feldern zugleich mit der Auszählung des Zwergsteinbrandbefalls auch jeweils die Unkrautgesellschaft pflanzensoziologisch nach Ellenberg (8) aufgenommen, um mit deren Hilfe die Reaktion des Bodens festzustellen.

Diese Untersuchung erbrachte drei Erkenntnisse:

1. Der stärkste Befall zeigte sich wieder auf dem sauersten Boden mit Befallsstärke 2 bis 3. Auf den weniger sauren Feldern war der Befall geringer, nahm aber in den tieferen Lagen an zwei Stellen wieder zu, wo offenbar auch die Bodengüte erheblich besser war. Man kann das Ergebnis wohl so formulieren, daß der Zwergsteinbrand ein saures Medium verträgt. Ob das stärkere Auftreten des Zwergsteinbrands im sauren Bereich in der ungünstigen Prädisposition der Wirtspflanze durch den sauren Boden begründet liegt, oder ob der Zwergsteinbrandpilz die saure Reaktion bevorzugt, wird noch zu klären sein.
2. Überall dort, wo viele Staunässeanzeiger wuchsen, wurde auch ein stärkerer Zwergsteinbrandbefall festgestellt. Offenbar wirkte also Staunässe brandfördernd, ohne daß jedoch die ursächlichen Zusammenhänge erkennbar sind.
3. Die saure Bodenreaktion nahm mit der Entfernung vom nördlichen Albrand nach Süden ab.

### 3. Höhenlage

Die Untersuchungen des Zwergsteinbrandauftretens im Jahre 1948 wie im Jahre 1949 ergaben den stärksten Befall in den höchsten Teilen der Alb, also dem Nordrand des Gebirges. Je mehr die Alb ins Donautal abfällt, desto schwächer wurde der Befall. Aus der Übersichtskarte (Abb. 9) über den Zwergsteinbrandbefall geht dies klar hervor. Die zahlreicheren Befallsfunde im Kreise Münsingen im Jahre 1949 gegenüber 1948 sind auf die systematische Untersuchung des ganzen Kreises im Jahre 1949 zurückzuführen (Abb. 9). Auch die Aufstellung über den Zwergsteinbrandbefall im

Kreise Münsingen zeigt diese Tendenz ganz deutlich (Abb. 10). Der Nordostteil des Kreises Münsingen grenzt an den Nordrand der Alb, während der südliche Teil ins Donautal abfällt.

Eine Erklärung dieser Tatsache durch die niedrige Temperatur in den größeren Höhenlagen oder die höhere Niederschlagsmenge an den Albrändern ist möglich.

Auch an einen Einfluß der Bodenreaktion ist zu denken. Die am nördlichen Albrand liegenden Felder sind am stärksten sauer, da der Kalkboden dort durch die höhere Niederschlagsmenge am stärksten ausgewaschen wurde. Da aber der Zwergsteinbrand die sauere Bodenreaktion besser als der gewöhnliche Steinbrand verträgt, könnte sein verstärktes Auftreten in den höchsten Lagen damit zusammenhängen, daß er auf diesen Böden besser mit dem gewöhnlichen Brand konkurrieren kann. Doch scheint es klar, daß es nicht die Bodenreaktion allein sein wird, die den starken Befall auf der Albhöhe hervorruft, zumal es sich offenbar hier um einen Komplex von einzelnen Faktoren handelt, die im gegenseitigen Zusammenwirken den hohen Befall erzeugen.

### 4. Feldrandbefall

Bei der Untersuchung der zwergsteinbrandbefallenen Felder im Jahre 1948 wurde fast ausnahmslos ein erheblich stärkerer Befall des Feldrandes bis etwa 10 m weit hinein gegenüber dem Feldinnern festgestellt. Nur ganz selten war der Befall außen wie innen gleich stark, nie aber am Rand schwächer. Am stärksten traten die zwergsteinbrandkranken Pflanzen auf einem Randstreifen von etwa 1 bis 2 m Breite auf. Dann verminderte sich der Befall schon bis etwa 10 m vom Rand weg und nahm von dort ab nach innen noch weiter ab.

Als Ursache des stärkeren Feldrandbefalls kommt die größere Bodenfestigkeit am Rand in Frage. Der Boden wird am Rand oft genügend stark aufgelockert, dafür aber vielfach fester getreten als im Feldinnern. Infolgedessen tritt eine gewisse Verfestigung des Bodens ein, wie auch an der Unkrautflora nachgewiesen werden kann.

Ein Versuch, durch künstliches Festtreten einer Parzelle durch Vieh den Einfluß der Bodenverfestigung auf den Zwergsteinbrandbefall experimentell zu prüfen, scheiterte leider an zu schwachem Auftreten des Brandes.

Nach den Erfahrungen des Jahres 1949 ist aber anzunehmen, daß der Randbefall nicht so sehr auf die Bodenfestigung zurückzuführen ist, als vielmehr auf die Belichtungs- und insbesondere die Standraumverhältnisse. Der Lichteinfall vom Rand her bis etwa 2 m tief ist erheblich stärker als im Feldinnern, zumal am Rand auch der Stand oft lückiger ist. Nach HIRLING (18) geht die verstärkte Lichteinwirkung so weit, wie der Bestand hoch ist. Zusätzlich konnte beobachtet werden, daß der Randbefall besonders dann stärker war, wenn sich an den Feldrand ein Weg, eine Wiese oder Schafweide anschloß, also keine hochwachsende Kultur wie andere Halmfrüchte. 1949 war in einem stark befallenen Feld mit Walthariweizen in Waldhausen infolge eines Säefehlers eine Drillreihe in etwa 60 m Länge ausgefallen. Zu beiden Seiten dieser freien Reihe wurde der Zwergsteinbrand in Stärke von 4, 5 und sogar 11 % festgestellt, während er im übrigen Feld nur etwa durchschnittlich 1 % ausmachte.

Zur Erklärung des stärkeren Randbefalls mußte insbesondere davon ausgegangen werden, daß der Bestand dort im allgemeinen lückiger ist als im Feldinnern; Lückennachbarn aber haben nicht nur bessere Licht-, sondern auch bessere Standraum- und ausreichende Ernährungsverhältnisse. Infolgedessen wachsen diese Pflanzen langsamer und bestocken sich stärker. Wie später noch bei Besprechung der Düngungseinwirkung zu zeigen sein wird, begünstigen diese Verhältnisse das Sichtbarwerden des Zwergsteinbrandbefalls.

Offenbar sind besonders die Bestockungstriebe späterer Ordnung von Zwergsteinbrand befallen. Am Feldrand, wo diese zur Ausbildung kommen, wird der Befall sichtbar. In der Feldmitte dagegen, wo sie vorzeitig unterdrückt werden, ist der Befall nicht erkennbar.

### 5. Beschränkung auf ein bestimmtes Gebiet

Die Tatsache der gebietsmäßigen festen Umgrenzung wurde auch in dem amerikanischen Weizenanbaugebiet im Nordwesten der Vereinigten Staaten beobachtet. Holton und Heald (23) schreiben, daß der „dwarf bunt" in Süd-Idaho, Nord-Utah, Montana und Washington vorkomme. Dort trete er aber offensichtlich schon jahrelang auf, und es beständen keine direkten Anzeichen für eine allgemeine Verbreitung auf andere Weizenanbaugebiete des Pazifischen Nordwestens. Allerdings beschreiben Rodenhiser und Holton (41) neun Jahre später doch ein erheblich weiter ausgedehntes Befallsgebiet und nehmen an, daß der Zwergsteinbrand sich soweit verbreitet hat. Möglicherweise ist aber der Befall auch erst im Laufe der Zeit festgestellt worden, während er vielleicht in schwächerem Ausmaße doch bereits vorher vorhanden war.

Ein genaues Bild über die Verbreitung des Zwergsteinbrands in Bayern war bislang leider nicht zu bekommen, doch sind es nach Wagner (50) auch festbegrenzte Gebiete, in denen er bisher auftritt, und zwar wird vor allem das Straubinger Weizenanbaugebiet und das Bayrische Schwaben genannt. Auch in Weihenstephan und bei Ingolstadt wurde er bereits festgestellt.

Eingehende Untersuchungen in Württemberg ergaben, daß das Befallsgebiet hier scharf mit dem Nordrand der Alb abschließt. Nach Süden zu erstreckt es sich über die Albabhänge bis in eine Höhe von etwa 540 m. Darunter wurde im Jahre 1948 kein Zwergsteinbrand mehr festgestellt. Im Jahre 1949 war das Auftreten erheblich schwächer und ging auch nur etwa bis zu einer Höhe von 620 m hinunter (Abb. 9). Außer diesem Gebiet wurde Zwergsteinbrand noch aus dem württembergischen Oberland aus der Gegend von Waldsee gemeldet. Ebenso wurde eine Fundstelle in Zeil bei Leutkirch festgestellt, die nach dem mikroskopischen Befund einwandfrei als Zwergsteinbrand erkannt wurde. In beiden Fällen handelt es sich um Moränenböden. Leider war es nicht möglich, die Befallsstellen in Süd-Württemberg selbst zu untersuchen, so daß nicht mit Sicherheit gesagt werden kann, ob sich das südwürttembergische Befallsgebiet auf die beiden obengenannten Fundstellen beschränkt.

Das Zwergsteinbrandgebiet umfaßt in Württemberg also hauptsächlich die Albanteile der Kreise Aalen, Schwäb. Gmünd, Heidenheim, Göppingen, Ulm, Münsingen, Reutlingen und Tuttlingen. Von besonderem Interesse war es nun, zu untersuchen, ob nicht doch ein Übergreifen ins Randgebiet vor der Alb festzustellen sei. Das Gebiet unmittelbar vor der Alb wurde

Abb. 9. Zwergsteinbrandbefall in Württemberg nach den Untersuchungen in den Jahren 1948 und 1949

daher besonders genau untersucht (Abb. 10). Es wurden Streuversuche im Gebiet vor der Alb angelegt, die bereits an anderer Stelle erwähnt wurden (Tab. 2). Alle diese Untersuchungen erbrachten keinen Fall von Zwergsteinbrand, so daß der nördliche Albrand vom Zwergsteinbrand noch nicht überschritten zu sein scheint.

## 6. Versuche mit Albboden

Es lag nahe, den Befall auf der Alb mit den Bodenverhältnissen in Verbindung zu bringen. 1947 wurde Albboden in Gefäßversuchen mit Weizen

untersucht. In keinem Gefäß trat aber Befall auf, obwohl der Boden in einigen Versuchsreihen mit 1 ccm Zwergsteinbrandsporen je Gefäß verseucht worden war.

Auch im Jahr 1948 wurden wieder Gefäße mit Albboden angesetzt und mit Weizen eingesät. Ohne besondere Behandung des Bodens wurde auch diesmal kein Befall erzielt. Lediglich nach Infektion des Bodens mit Zwergsteinbrandsporen wurden Zwergsteinbrandpflanzen erzeugt.

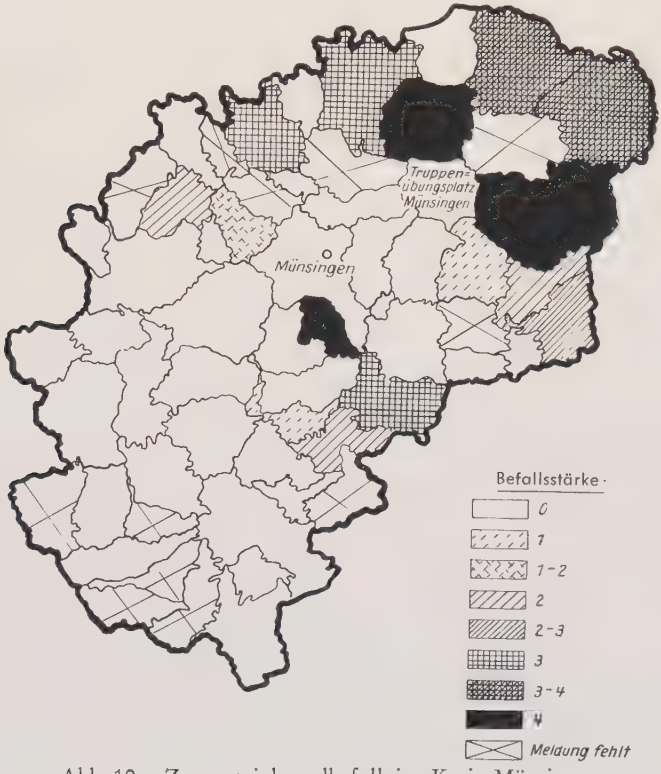



Abb. 10. Zwergsteinbrandbefall im Kreis Münsingen im Jahr 1949

Mit diesen Versuchen dürfte wohl bewiesen sein, daß die Bodenart keine maßgebende Rolle für das Auftreten des Zwergsteinbrands in diesem eng abgegrenzten Gebiet spielt. Das beweist auch das Auftreten auf ganz verschiedenen Bodenarten in Bayern und Oberschwaben.

Rodenhiser und Holton (41) erwähnen in einer Aufstellung des amerikanischen Zwergsteinbrandgebietes auch die verschiedensten Landstriche in sehr unterschiedlichen klimatischen Boden- und Höhenlagen als befallen.

### b) Einfluß von Saatgut und Sorte bei Weizen und Dinkel

#### 1. Möglichkeit einer Verschleppung durch Saatgut

Es ist eine wesentliche Frage, ob Zwergsteinbrand durch das Saatgut aus dem jetzigen Befallsgebiet in andere Gebiete verschleppt werden kann. Zwar

war die künstliche Saatgutinfektion unmittelbar nicht geglückt. Doch liegt es im Bereich der Möglichkeit, daß mit dem Saatgut verschleppte Sporen im Boden keimfähig verbleiben und erst bei einem späteren Weizenanbau vom Boden her befallen können. Nur so kann es erklärt werden, daß, obwohl die künstliche Saatgutinfektion keine positiven Ergebnisse brachte, auf der anderen Seite ein Umsichgreifen des Zwergsteinbrandbefalls nicht zu übersehen ist.

2. Verhalten der Sorten

Von besonderer Bedeutung, vor allem auch für eine Resistenzzüchtung, ist das Verhalten der einzelnen Sorten zum Zwergsteinbrand. Auf diesem Gebiete ist in den Vereinigten Staaten von Amerika von HOLTON und SUNESON (22) und von RODENHISER und HOLTON (41) eingehend gearbeitet worden.

Von 52 Weizensorten, die erstere prüften, zeigten 31 im Durchschnitt weniger als 10 % Zwergsteinbrand, die anderen 21 Sorten 11 bis 76,5 % Befall. Unter den resistenten Sorten waren Relief, Rex, Requa, Hymar, Minturki, Albit und Ridit, unter den anfälligen Oro, Kharkoff, Turkey, Rio und Yogo.

Es waren rein örtlich auch Unterschiede im Auftreten festzustellen, sogar in den einzelnen Zuchtgärten zeigten die einzelnen Sorten unterschiedlichen Befall. RODENHISER und HOLTON (41) stellten im Jahr 1945 fest, daß die sogenannten Hussar-, Ridit- und Martin-Faktoren die Resistenz gegen den Zwergsteinbrand wirksam steuern. Die beste Resistenz gegen alle Steinbrandarten einschließlich des Zwergsteinbrands haben theoretisch diejenigen Sorten, die die Resistenz von Oro und Martin vereinigen, die von den Sorten Rio bzw. Rex getragen werden. So zeigten sich Rex × Oro und Rex × Rio gegen alle Steinbrand- und Zwergsteinbrandrassen resistent.

Das Problem in den Zwergsteinbrandgebieten von USA besteht darin, daß die angebauten Handelssorten Relief, Cache und Wasatch gegen Zwergsteinbrand zwar resistent sind, aber nicht gegen bestimmte *Tilletia-tritici-* und *T.-foetens*-Rassen, die im gleichen Gebiet vorkommen.

Nach FUCHS (11) sind TINGEY und WOODWARD zu der Feststellung gekommen, daß Martin und Hussar sehr resistent seien, etwas weniger Ridit, Minturki, Relief, Cache, Hymar und Wasatch.

HOLTON, BAMBERG und WOODWARD (22) fanden, daß nur die Varietäten, die den Martin-Hussar-Genkomplex enthalten, gegen Zwergsteinbrand hochresistent sind. Nach ihnen sind Varietäten mit dem Ridit-Typus mäßig resistent, während die mit dem Turkey-Faktor empfänglicher sind.

Zur Feststellung der Verhältnisse bei den deutschen Sorten wurden zunächst im Jahr 1948 Auszählungen im Landessortenversuch der Landwirtschaftsschule Geislingen auf dem Christophshof mit sieben Weizen- und zwei Dinkelsorten vorgenommen. Das Ergebnis der Auszählungen von den kranken Ähren auf jeweils 20 qm ist aus Tab. 4 zu ersehen.

Von den Weizensorten waren Wahrberger Ruf und Taca am schwächsten befallen. Mittelmäßig war der Befall beim Hohenwettersbacher, Walthari und Tassilo, während der Zwergsteinbrand am stärksten in Heges Basalt und

Trubilo auftrat. Bei den Dinkeln war Rechbergs Brauner Winterspelz etwas stärker als Steiners Roter Tiroler befallen.

*Tabelle 4*

Auszählungen der zwergsteinbrandkranken Ähren in dem Landessortenversuch der Landwirtschaftsschule Geislingen auf dem Christophshof 1948

| Sorte | | Zahl der befallenen Ähren je 20 qm |
|---|---|---|
| Heges Basalt | Winterweizen | 96 |
| Wahrberger Ruf | „ | 14 |
| Trubilo | „ | 82 |
| Hohenwettersbacher | „ | 32 |
| Taca | „ | 13 |
| Walthari | „ | 36 |
| Tassilo | „ | 39 |
| Roter Tiroler | Dinkel | 24 |
| Rechbergs Br. Dinkel | „ | 42 |

Ein weiterer Sortenversuch wurde auf der Gräfl. Rechbergschen Domäne Lützelalb ausgezählt. Der Befall war schwächer, wie Tab. 5 zeigt. Es wurden die zwergsteinbrandkranken Pflanzen je 10 qm ausgezählt. Hier waren am stärksten Bayernkönig und Trubilo befallen, während Heges Basalt, Taca, Lichti und Herold am schwächsten befallen waren. Von den angebauten Dinkeln zeigte lediglich Rechbergs Früher eine kranke Pflanze, während alle anderen Sorten befallsfrei waren.

*Tabelle 5*

Auszählung der zwergsteinbrandkranken Ähren in dem Sortenversuch Lützelalb 1948

| Sorte | | Zahl der befallenen Ähren je 10 qm |
|---|---|---|
| Heges Basalt | Winterweizen | 1 |
| Trubilo | „ | 9 |
| Taca | „ | 1 |
| Walthari | „ | 4 |
| Tassilo | „ | 8 |
| Bayernkönig | „ | 10 |
| Lichti | „ | 2 |
| Herold | „ | 2 |
| Babenhauser | Dinkel | 0 |
| Rechbergs Früher | „ | 1 |
| Rottweiler Frühkorn | „ | 0 |
| Roter Tiroler | „ | 0 |
| Rechbergs Br. Dinkel | „ | 0 |

Als Ergebnis der Untersuchungen des ersten Jahres konnte also festgestellt werden, daß Wahrberger Ruf und Taca am stärksten resistent gegen Zwergsteinbrand, Heges Basalt, Trubilo und Bayernkönig am anfälligsten

*Tabelle 6*

Versuche über die Anfälligkeit der Sorten gegen Zwergsteinbrand in Lützelalb, Waldhausen und Ruppertstetten
(Anzahl der in den einzelnen Parzellen mit Kurzsteinbrand befallenen Ähren)

a = unbehandelt; b = gebeizt mit Ceresan trock. 200 g/100 kg; c = mit kurzen Steinbrandsporen infiziert, 200 g/100 kg
A = 1. Wiederholung; B = 2. Wiederholung

| Lfd. Nr. | Sorte | Behandlung | Lützelalb | | Waldhausen | | Ruppertstetten | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | A | B | A | B | A | B |
| | | **Weizen** | | | | | | |
| 1 | Trubilo | a | | | | | | |
| | | b | | | | 1 | | |
| | | c | | 1 | | | | |
| 2 | Basalt | a | | | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | 11 | | | | |
| 3 | Tassilo | a | | | | | | |
| | | b | | | | | | 1 |
| | | c | | | | | | |
| 4 | Wahrberger Ruf | a | | | 2 | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | | | | | |
| 5 | Dornburger Heils Dickkopf | a | | | | | | |
| | | b | | | 2 | | | |
| | | c | | 1 | 1 | | | |
| 6 | Ridit | a | | | nicht geprüft | | nicht geprüft | |
| | | b | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | c | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| 7 | Hussar | a | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | b | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | c | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| 8 | Minturki | a | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | b | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | c | 4 | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| 9 | Hohenheimer Stamm 29 | a | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | b | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | c | | | ,, | ,, | ,, | ,, |
| | | **Dinkel** | | | | | | |
| 1 | Roter Tiroler | a | | 2 | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | | 7 | | | |
| 2 | Rottweiler Frühkorn | a | | | 6 | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | 3 | | 10 | | 5 | |
| 3 | Babenhauser | a | | | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | 6 | | | | | |
| 4 | Zeiners | a | 1 | | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | 1 | 1 | | | |
| 5 | Vorarlberger Landdinkel (braun) | a | | | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | 5 | | | | 7 | 2 |
| 6 | Vorarlberger Landdinkel (weiß) | a | | | 4 | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | 4 | 2 | 9 | | | |
| 7 | Rechbergs Früher | a | | | | | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | | 4 | | | |
| 8 | Rechbergs Brauner | a | | | | 2 | | |
| | | b | | | | | | |
| | | c | | | | | | |

waren. Die Dinkel unterschieden sich kaum voneinander in ihrer Anfälligkeit.

Um die Ergebnisse zu erhärten und gleichzeitig Unterlagen für eventuelle Resistenzzüchtungen zu bekommen, wurden im Jahre 1948/49 an drei Stellen auf der Alb in Ruppertstetten, Lützelalb und Waldhausen Sortenversuche in größerem Umfange angelegt. Von Weizensorten wurden Trubilo, Heges Basalt und Tassilo als landesübliche Sorten aufgenommen. Von den bisher steinbrandresistenten Sorten wurden Wahrberger Ruf, Dornburger Heils Dickkopf und gleichzeitig auch die drei amerikanischen Sorten Ridit, Hussar und Minturki, die in Amerika als steinbrand- und zwergsteinbrandresistent festgestellt worden waren, angebaut. Dazu kam noch der Stamm 29 der Landessaatzuchtanstalt Hohenheim, der bereits als resistent gegen den gewöhnlichen Steinbrand bekannt war.

Von den Dinkeln wurden alle bekannten Sorten untersucht.

Die Sorten und Kreuzungen wurden jeweils in zweifacher Wiederholung und je unbehandelt, gebeizt und mit Zwergsteinbrandsporen infiziert ausgesät.

Leider war der Befall, wie schon mehrfach betont, im Jahre 1949 äußerst schwach, so daß eine regelrechte Auswertung der Versuche gar nicht möglich war. Es konnte praktisch nur eine negative Auslese getroffen werden, indem nämlich die Sorten, die trotz der offenbar im Jahre 1949 äußerst ungünstigen Infektionsbedingungen noch stärker befallen waren, als sehr anfällig angesprochen werden können. Dagegen ist mit einem Ausbleiben des Befalls auf einer Sorte im Jahre 1949 ihre Resistenz nicht bewiesen (Tab. 6).

Aus den Versuchen ist zu ersehen, daß von allen geprüften Weizensorten lediglich die beiden amerikanischen Sorten Ridit und Hussar sowie der Hohenheimer Stamm 29 befallsfrei blieben. Die steinbrandresistenten Sorten Wahrberger Ruf und Dornburger Heils Dickkopf wurden beide von Zwergsteinbrand befallen, letztere sogar verhältnismäßig stark. Bei den Dinkeln war festzustellen, daß zwar auch alle befallen waren, daß aber die landesüblichen Sorten, vor allem Rechbergs Brauner und Früher Winterspelz und Steiners Roter Tiroler, den geringsten Befall zeigten.

Die Untersuchung über den allgemeinen Zwergsteinbrandbefall im Jahre 1949 ergab bei den Weizensorten, daß diesmal vor allem Trubilo, Tassilo und bei weitem am stärksten Walthari als befallen festgestellt wurden. Dies ist um so erstaunlicher, als Walthari im vorangegangenen Jahr nur mittelmäßig befallen war. Dieselbe Feststellung wurde auch bei einer Auszählung im Landessortenversuch der Landwirtschaftsschule Geislingen in Waldhausen gemacht, den Tab. 7 zeigt.

Noch merkwürdiger war das Verhalten der Dinkel, die im Jahre 1949 so gut wie nicht befallen waren. Trotz eifrigen Suchens wurde nur ein Fall starken Auftretens von Zwergsteinbrand in Steiners Rotem Tiroler festgestellt, der aber auf besondere Verhältnisse zurückzuführen war, die weiter unten noch erläutert werden. In ähnlicher Weise wies bereits im Jahre 1947 in einem Zwergsteinbrandversuch des Pflanzenschutzamtes Stuttgart der Weizen (Heges Basalt), einen Befall von 5,9 bis 16,7 %, der Dinkel (Steiners Roter Tiroler) nur einen solchen von 0,1 bis 0,7 % auf.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß bei den deutschen Sorten bisher noch keine ausreichende Resistenz festgestellt werden konnte. Sorten, wie Wahrburger Ruf, die im Jahre 1948 sehr schwach befallen waren, zeigten 1949 erhöhte Anfälligkeit. Gänzlich ungeklärt ist das Verhalten des Dinkels, der im Jahre 1948 die höchsten Befallsziffern aufwies, dagegen im Jahre 1949 außerhalb der Versuche fast befallsfrei gefunden wurde.

*Tabelle 7*

Auszählungen der zwergsteinbrandkranken Ähren in dem Landessortenversuch der Landwirtschaftsschule Geislingen in Waldhausen 1949
Parzellengröße: 10 qm

| Sorte | Wiederholung | Zahl der befallenen Ähren |
|---|---|---|
| Wahrberger Ruf | a | 6 |
| | b | 1 |
| Heges Basalt | a | 3 |
| | b | 3 |
| Walthari | a | 16 |
| | b | 11 |

Offenbar sind auch in Deutschland im Auftreten des Zwergsteinbrands Schwankungen, wie sie HOLTON in den Vereinigten Staaten bereits beobachtete, festzustellen, so daß für die Untersuchung der Anfälligkeit von Sorten längere Zeiträume erforderlich sind, solange eine sichere Methodik der künstlichen Infektion noch nicht gefunden ist. Doch zeigen sich durch eventuelle Einkreuzung amerikanischer Sorten schon jetzt Wege für eine Resistenzzüchtung.

Eine Übereinstimmung der Resistenz von Sorten gegen *Tilletia tritici* und gegen Zwergsteinbrand war in meinen Versuchen nicht festzustellen. Die steinbrandresistenten Sorten Dornburger Heils Dickkopf und Wahrberger Ruf wurden beide befallen. Nur der Hohenheimer Stamm 29 (eine Kreuzung aus dem Hohenheimer 77 × Hohenheimer Dickkopf), der wohl von ersterem die Steinbrandresistenz mitbekommen hat, wurde 1948, 1949 und 1950 nicht vom Zwergsteinbrand befallen. Auch in der amerikanischen Resistenzzüchtung macht die Kombination der Resistenz gegen den gewöhnlichen Steinbrand und den Zwergsteinbrand große Schwierigkeiten.

### c) Einfluß der Vorfrucht

Der stark unterschiedliche Befall, selbst nächst benachbarter Weizen- und Dinkelfelder, ließ auch eine Untersuchung des Einflusses der Vorfrucht auf das Zwergsteinbrandauftreten geraten erscheinen. Zwischen den einzelnen Hackfrüchten, wie Kartoffeln, Kohlrüben oder Futterrüben als Vorfrucht zeigte sich kein Unterschied. Dagegen erfolgte nach Klee, Luzerne, Erbsen oder anderen Hülsenfrüchten im allgemeinen ein Ansteigen des Befalls. Sowohl 1948 als auch 1949 waren Fälle von stärkerem Zwergsteinbrandauftreten zu beobachten, die sich bei Beurteilung aller in Frage kommenden

Faktoren nur auf die Vorfrucht zurückführen ließen. So war ein Schlag in Waldhausen mit Walthari bestellt, der als Vorfrucht Kartoffeln und Ackerbohnen aufwies. Obwohl alle anderen Faktoren die gleichen waren, betrug der Zwergsteinbrandbefall bei Vorfrucht Kartoffeln 5 bis 6 %, bei Ackerbohnen dagegen bis 11 %. In einem weiteren Fall stand in Hofstett-Emerbuch ein Schlag mit Rüben und Klee als Vorfrucht, wo nach Rüben das Feld fast befallsfrei war, nach Klee dagegen 6 bis 8 % Befall gefunden wurde. So könnten noch einige weitere Beispiele angeführt werden.

Der starke Befall ist wohl auf die Stickstoffwirkung der Leguminosen zurückzuführen. Diese Annahme wird gestützt durch ähnliche Beobachtungen bei der gleich zu behandelnden Düngerfrage.

### d) Einfluß der Düngung

Bei der Untersuchung des Einflusses der Düngung auf das Auftreten des Zwergsteinbrands wurde erkannt, daß hier offenbar einer der wichtigsten Faktoren für die Stärke des Befalls vorliegt.

1. Handelsdünger

Über die Einwirkung der Handelsdünger auf den Befall durch Zwergsteinbrand ist bislang nichts bekannt geworden.

Die angestellten Untersuchungen waren sehr schwierig, da weder die Keimung der Sporen gelungen und dadurch die direkte Einwirkung der Düngemittel nicht festzustellen war, noch eine künstliche Infektionsmethode für die Anlage von Düngungsversuchen in Gefäßen oder im Freiland bestand.

Beobachtungen über die Auswirkungen der einzelnen Düngemittel waren lediglich beim Kalkstickstoff zu machen. Er scheint, ebenso wie beim gewöhnlichen Steinbrand (Rademacher 37), eine stark hemmende Wirkung auszuüben.

In Waldhausen war auf einem Schlag, der Kartoffeln, Flachs und Ackerbohnen zur Vorfrucht hatte und mit dem sehr anfälligen Walthari bebaut war, eine interessante Beobachtung über die Kalkstickstoffwirkung zu machen. Zunächst erhielt der gesamte Schlag 80 kg/ha Kalkstickstoff. Als sich aber der nach Flachs stehende Weizen nicht recht entwickeln wollte, wurde ihm eine zusätzliche starke Gabe Kalkstickstoff gegeben. Daraufhin zeigte der Weizen nach Flachs nur am Rand 1,5 % Befall, im Feldinnern dagegen gar keinen, während nach den anderen Vorfrüchten 4, 5 und 6 % Befall gefunden wurde.

In Bremelau wurde nach Klee Weizen (Sorte Trubilo) eingesät, der mit 70 kg/ha Kalkstickstoff gedüngt wurde. Obwohl der Acker im Herbst noch Stallmist erhielt und im Herbst und Frühjahr mit Jauche überfahren wurde, was, wie weiter unten noch näher zu erklären ist, sonst einen starken Befall hervorgerufen hätte, blieb der Acker befallsfrei. Diese zwei Beispiele zeigen, daß der Kalkstickstoff im Jahre 1948/49 eine stark hemmende Wirkung auf das Auftreten des Zwergsteinbrands hatte. In exakten Versuchen im Jahre 1950/51 mit verschieden hohen Kalkstickstoffgaben zu verschiedenen Zeiten vor der Herbstsaat konnte jedoch in keinem Falle eine befallsvermin-

dernde Wirkung festgestellt werden, so daß zur Klärung dieser Frage weitere Untersuchungen nötig sind.

2. Wirtschaftsdünger

Über die Einwirkung des Stalldüngers auf den Zwergsteinbrand ist bei den amerikanischen Autoren nichts zu finden, offenbar deshalb, weil der Stallmist im Nordwesten der Vereinigten Staaten nur eine ganz untergeordnete Rolle spielt.

Bei der eigenen Untersuchung des Zwergsteinbrandauftretens im Jahre 1948 bestätigte es sich aber immer mehr, daß der Stallmist eine sehr wesentliche Rolle für den Befall spielt.

An zahlreichen Beispielen im Jahre 1948 ließ sich nachweisen, daß der Befall um so stärker war, je näher der Termin der letzten Stallmistdüngung lag. Ganz besonders zeigte sich diese Tatsache bei vielen kleinbäuerlichen Betrieben auf der Alb, die regelmäßig eine Düngung der Weizen- oder Dinkelfelder direkt vor der Saat mit Stallmist oder Jauche vornehmen. In diesen Fällen war fast ausnahmslos eine starke Zwergsteinbrandzunahme festzustellen. Eine weitere Bestätigung für die Rolle des Stallmists ergab folgende Beobachtung: An zwei Stellen zeigte Dinkel auf umgebrochener Schafweide, die noch keine Stallmistgabe erhalten hatte, gar kein bzw. nur spurenweises Auftreten von Zwergsteinbrand, während die angrenzenden Felder der gleichen Sorte stärksten Befall aufwiesen.

Es schien daher wert, diese Feststellungen durch exakte Versuche zu erhärten. Leider blieben mehrere Gefäßversuche und Feldversuche ohne genügenden Befall.

Ein weiterer Versuch sollte zeigen, ob das stärkere Auftreten des Zwergsteinbrands nach Stallmistdüngung auf Infektion durch Sporen von befallenem Stroh oder auf die Düngerwirkung an sich zurückzuführen sei. Eine Schafweide, die seit Menschengedenken keinem anderen Zwecke gedient hatte, wurde umgebrochen, zwei Ar mit Mist von stark befallenem Dinkel aus Ruppertstetten, und zwei weitere Ar mit Mist vom Ramsberg, einer Gegend ohne Zwergsteinbrandbefall, gedüngt. Weitere zwei Ar wurden mit Jauche gedüngt und zwei Ar blieben unbehandelt. Das Ergebnis war recht unerwartet. Auf der Fläche, die mit Ruppertstettener Stallmist gedüngt war, fanden sich neun Zwergsteinbrandähren, auf der mit Ramsberger Stallmist gedüngten Parzelle wurde eine kranke Ähre gefunden und auf der mit Jauche gedüngten acht Zwergsteinbrandähren. Die unbehandelte Parzelle war befallsfrei. Zur Beurteilung des Ergebnisses ist zu bemerken, daß es sich auch hier um einen Versuch mit Dinkel in dem sonst kaum befallenen Ruppertstetten handelt.

Der verhältnismäßig starke Befall durch den Stallmist und die Jauche spricht hier für eine mögliche Übertragung der Sporen durch den Wirtschaftsdünger. Es ist durchaus denkbar, daß die Zwergsteinbrandsporen infolge ihrer stärkeren Wandung auf dem Verdauungswege nicht in dem Maß abgetötet werden, wie etwa die gewöhnlichen Brandsporen. Die einzige Zwergsteinbrandpflanze auf dem mit Ramsberger Stallmist behandelten Stück ist wohl durch anderweitige Verschleppung von Sporen zu erklären.

In den Untersuchungen des Jahres 1948 wurde die Jauche zunächst außer acht gelassen. 1949 wurde jedoch in mehreren Fällen einwandfrei eine Zwergsteinbrandförderung bei vorheriger Jauchedüngung festgestellt. In einem besonders eindrucksvollen Fall (Ennabeuren 1949) waren zwei Felder am Hange unterhalb einer wiederholt mit Jauche überfahrenen Baumwiese in deren Sickerbereich am Rand auf 1½ bis 2 m Tiefe besonders stark befallen, darunter ein Feld mit dem 1948 kaum befallenen Roten Tiroler Dinkel zu 16 %.

1948/49 wurde deshalb die Jauche mit in den Plan des Versuches auf umgebrochener Schafweide in Ruppertstetten hineingenommen. Nach dem oben besprochenen Untersuchungsergebnis ist es möglich, daß auch durch Jauche Zwergsteinbrandsporen verschleppt werden können. Doch wäre auch hier, ebenso wie beim Stallmist, an eine rein wuchsfördernde Wirkung auf den Pilz oder auch auf den Wirt zu denken.

Weitere Möglichkeiten, den Einfluß von Stallmist und Jauche zu beobachten, gaben die kleinbäuerlichen Betriebe, welche noch sehr oft den Weizen mit Jauche und Stallmist düngen. Mitunter waren Weizenfelder festzustellen, die im Herbst zur Einsaat eine Stallmistgabe erhielten, anschließend mit Jauche überfahren wurden und im Frühjahr noch einmal eine Jauchedüngung bekamen. Trotz des schwachen Zwergsteinbrandauftretens im Jahre 1949 zeigte sich genau wie 1948 dessen deutliche Förderung durch die Anwendung dieser Wirtschaftsdünger.

Die Wirkung des Wirtschaftsdüngers kann, wie bereits oben gesagt, durch eine Verschleppung der Zwergsteinbrandsporen mit Mist oder Jauche erklärt werden. Es sprechen aber andere Argumente dafür, daß es sich bei der Wirkung des Wirtschaftsdüngers nicht allein um eine Verschleppung von Sporen handeln kann. So ist im Jahr 1948 einmal und im Jahr 1949 zweimal festgestellt worden, daß Jauche auch eine befallssteigernde Wirkung hat, wenn sie erst im Frühjahr auf den Weizen gegeben wird. In diesen drei Fällen wurde sonst keine Stallmist- oder Jauchegabe verabreicht. Da an eine förderliche Wirkung auf den Pilz und die Infektion im Frühjahr schwerlich noch geglaubt werden kann, muß hier eine solche auf den Wirt vorliegen.

Mehrfach wurde durch Schafpferch eine starke Vermehrung des Zwergsteinbrands bewirkt. Auch hier liegt die Annahme einer Wirkung auf die Weizenpflanzen näher als diejenige einer möglichen Übertragung durch die Hufe der Tiere.

Nach diesen Betrachtungen bleibt aber immer noch die Art der Einwirkung offen. Hier sei zum Vergleich noch einmal die stark zwergsteinbrandfördernde Wirkung der stickstoffsammelnden Leguminosen herangezogen, welche auch für die Wirtschaftsdünger die Möglichkeit einer ursächlichen Wirkung der langsam fließenden Stickstoffquelle ergibt. Beide wirken in der Weise nachhaltig auf die Pflanze ein, daß einerseits das Wachstum verlangsamt wird, andererseits aber auch schwächliche und verspätete Triebe noch zur Ährenbildung kommen. Es dürften dadurch sowohl dem Pilz das Erreichen der Ährenanlagen erleichtert wie auch befallene Nach-

schößlinge als solche erst erkennbar werden. Diese Erklärung der Wirkung des Wirtschaftsdüngers hat meines Erachtens am meisten Wahrscheinlichkeit für sich. Daß eine ähnlich starke Wirkung nicht bei den mineralischen Salpeterdüngern zu beobachten ist, liegt wohl an deren andersartiger Wirkungsweise.

Zusammenfassend kann über den stärkeren Befall nach Stallmist und Jauche folgendes festgestellt werden:

1. Das Auftreten nach direkten Gaben von Wirtschaftsdünger kann seine Ursache in einer Verschleppung der Zwergsteinbrandsporen durch Stallmist oder Jauche haben.
2. Der Pilz kann unmittelbar oder auf dem Umweg über eine Beeinflussung der Mikroflora in einem für die Keimung und Entwicklung der Zwergsteinbrandsporen günstigen Sinne beeinflußt werden.
3. Schließlich ist auch eine Beeinflussung der Wirtspflanze durch die Wirtschaftsdünger gegeben.
   a) Infolge der guten Nährstoffversorgung ist der Wuchs erheblich langsamer als bei normal ernährten Pflanzen. Sie verharren dadurch länger im anfälligen Stadium.
   b) Durch eine reichliche und nachhaltig wirkende Stallmist- oder Jauchegabe erreichen auch befallene Kümmerhalme noch den Anschluß und die Ährenbildung.
   c) Infolge der stärkeren Bestockung der Wirtspflanze kann der Pilz mehr leichter anfällige Nebentriebe infizieren.

### e) Einfluß der Saatzeit, Witterung und Bodenfeuchtigkeit

Da die drei Faktoren Saatzeit, Witterung und Bodenfeuchtigkeit in ihrer Einwirkung auf die Stärke des Zwergsteinbrandbefalls offenbar zusammenwirken, sollen sie hier auch gemeinsam besprochen werden.

In einem Bericht vom 8. August 1942 vom Pflanzenschutzamt Stuttgart erwähnt Dr. KLETT unter anderem, daß nach Aussaat am 23. September ein starker Zwergsteinbrandbefall eintrat, während die am 23. Oktober herausgebrachten Versuche befallsfrei blieben.

Daher wurde im Jahre 1948 die Einwirkung der Saatzeit besonders untersucht. Ganz allgemein war dabei festzustellen, daß diese einen sehr bedeutenden Einfluß auf den Befall mit Zwergsteinbrand ausübte. Man konnte einwandfrei sehen, daß der Befall desto stärker war, je eher die Saat erfolgte. Nur bei den niedrigsten Lagen unter 640 m kam dies nicht so klar zum Ausdruck, was aber durch das sowieso nur schwache Auftreten unterhalb dieser Höhe ohne weiteres begründet ist.

Ein Vergleich der Feldversuche des Jahres 1948 nach ihrer Aussaatzeit und ihrem Befall zeigte klare Unterschiede: Am stärksten befallen waren die Versuche in Lützelalb, die am 24. September ausgesät waren. Dann folgten an zweiter Stelle die Waldhausener Versuche, am 4. Oktober ausgesät, und am schwächsten befallen waren die Flächen in Ruppertstetten, die erst am 18. Oktober gesät werden konnten.

Der Einfluß der Saatzeit wurde im Jahre 1949 weiter beobachtet und zeigte auch hier wieder dasselbe Bild einer starken Befallssteigerung bei früher Aussaat.

Die Frage nach der Deutung dieser klaren Tendenz ist wohl aus der Infektion des Pilzes vom Boden her zu erklären. Da es in den beiden

Herbsten 1947 und 1948 ausgesprochen trocken war, brauchten die jungen Weizenpflanzen sehr lange, bis sie aus dem Boden kamen. Da der Regen in beiden Jahren erst um Mitte bzw. Ende Oktober einsetzte, waren die Pflanzen, die am frühesten gesät waren, auch der Infektion des Pilzes vom Boden her am längsten ausgesetzt. Es kann daher für den Zwergsteinbrand angenommen werden, daß die Infektion um so eher und sicherer erfolgt, je länger bei noch einigermaßen optimalen Temperaturen für den Pilz die Weizenpflanze zum Keimen und Auflaufen benötigt.

Auf diese Weise ist der Einfluß der Saatzeit für das einzelne Feld zwar gut zu erklären, doch bleibt noch offen, warum der allgemeine Befall im Jahre 1948 so sehr stark war, im Jahre 1949 aber so schwach. Die Herbstwitterung war im Jahre 1948 von der im Jahre 1947 kaum verschieden, so daß sie für eine Klärung dieser Frage nicht herangezogen werden kann. Es ist vielleicht auch in unserem Befallsgebiet mit einem turnusmäßigen Auftreten des Zwergsteinbrands zu rechnen, wie es Holton und Suneson (22) auch in Amerika beobachteten.

### f) Saatgutbeizung

In den Jahren 1936 und 1937 kamen die ersten Reklamationen wegen ungenügender Brandwirksamkeit der Mittel von der Alb an die Vertreter der Beizmittelfirmen, ohne daß damals der Zwergsteinbrand schon bekannt war.

In Amerika stellten Holton und Suneson (24) ebenfalls fest, daß der Zwergsteinbrand durch Beizung nicht zu bekämpfen ist.

Vom Pflanzenschutzamt Stuttgart wurden im Herbst 1946 im Zwergsteinbrandgebiet zwei Feldversuche zur Bekämpfung des Zwergsteinbrands mit den damals üblichen Quecksilber-Trocken- und Naßbeizmitteln, sowie mit Formaldehyd angelegt. Als Saatgut wurde in einem Versuch Heges Basalt, im anderen Steiners Roter Tiroler ausgesät, die beide mit *Tilletia-tritici*-Sporen infiziert waren. Es wurde damals nämlich vermutet, daß der Zwergsteinbrand durch gewöhnliche Steinbrandsporen hervorgerufen werde und die Verzwergung nur auf bestimmte Bedingungen zurückzuführen sei. Sowohl die Weizen- als auch die Dinkelparzellen waren sämtlich mit Zwergsteinbrand befallen, so daß eine befallsverhindernde Wirkung der beiden Beizmittel nicht beobachtet werden konnte.

Der Versuch wurde im Jahre 1947/48 noch einmal wiederholt, nur mit der Erweiterung, daß neben die Parzellen, wo das Saatgut mit gewöhnlichen Tilletia-Sporen infiziert war, jeweils auch noch Parzellen, deren Saatgut mit Zwergsteinbrandsporen infiziert war, traten. Der Erfolg ist aus Tab. 1 zu ersehen.

Auch hier war eine Behandlung mit den üblichen Beizmitteln nicht erfolgreich, so daß also weder mit den quecksilberhaltigen Beizmitteln noch mit Formalin gegen den Zwergsteinbrand etwas erreicht wurde.

Es sei hier noch erwähnt, daß auch Versuche mit organischen Beizmitteln der Farbwerke Hoechst, unter anderen auch mit Tritisan, einem Pentachlornitrobenzol, im Jahre 1949 durchgeführt wurden. Über ihre Wirkung kann

auf Grund des geringen Befalls noch nichts mit Sicherheit gesagt werden. Doch war die Tritisanparzelle, wenn auch schwach, mit Zwergsteinbrand befallen. Nach Untersuchungen von RADEMACHER (38) gelingt es, durch Beizung mit Tritisan dem Weizen auch einen ausreichenden Schutz gegen Bodeninfektion durch *Tilletia tritici* zu verleihen. Da es sich offenbar auch bei Zwergsteinbrand um eine Bodeninfektion handelt, sollte es möglich sein, hier einen Weg zur Bekämpfung zu finden.

### g) Verhalten zum gewöhnlichen Steinbrand (Tilletia tritici)

BAMBERG, HOLTON, RODENHISER und WOODWARD (4) beobachteten, daß der Zwergsteinbrand nur gelegentlich einmal mit dem gewöhnlichen Steinbrand in der gleichen Weizenpflanze nebeneinander vorkommt. Sie vermuteten daher, daß die Entwicklungsprozesse der beiden Pilze entweder zur Zeit der Infektion oder während der Entwicklung in der Wirtspflanze antagonistischer Art sind. In ausgedehnten Versuchen wiesen sie nach, daß der gewöhnliche Steinbrand auf Weizen die Entwicklung des Zwergsteinbrands unterdrückt. Die Art und Weise dieser Beeinflussung aber ist ihnen unbekannt.

Dieselben Beobachtungen im Verhalten des gewöhnlichen Steinbrands zum Zwergsteinbrand konnten auch in meinen Untersuchungen gemacht werden. Bei dem Beizwirkungsversuch auf dem Christophshof im Jahre 1947/48 trat in Gruppe 3, die mit gewöhnlichem Steinbrand infiziert, aber nicht gebeizt war, in zwei Wiederholungen gar kein Zwergsteinbrand auf, in der dritten Wiederholung nur zehn Ähren. Demgegenüber wurden in den Gruppen, in denen die Infektion mit *Tilletia tritici* durch Beizung weitgehend ausgeschaltet war, bis zu 41 Zwergsteinbrandähren je Teilstück gezählt.

Hier war also offensichtlich eine Unterdrückung des Zwergsteinbrands durch den gewöhnlichen Steinbrand festzustellen. Ferner wurden im Jahre 1948 in Weißenstein zwei Felder gefunden, die einen Befall von über 80 % gewöhnlichem Steinbrand aufwiesen. Obwohl in der Umgebung stärkster Zwergsteinbrandbefall auftrat, waren in den beiden Feldern nur verschwindend wenige Zwergsteinbrandähren zu finden. Im Jahre 1949 wurde auf fünf Feldern, auf denen das Saatgut nicht gebeizt war, sehr starkes gewöhnliches Steinbrandauftreten mit Befall bis zu 30 und 40 % festgestellt. Auf vier von diesen fünf Feldern konnte überhaupt kein Zwergsteinbrand festgestellt werden; an einem Ort war das Verhältnis zwischen gewöhnlichem Steinbrand und Zwergsteinbrand 4 : 1. Da diese Felder jeweils in der Nähe von stärker befallenen Zwergsteinbrandschlägen lagen, wurde durch diese Beobachtungen die Erfahrung des Jahres 1948 bestätigt.

Die Erklärung dieser Tatsache scheint darin zu liegen, daß der gewöhnliche Steinbrand den Weizenkeimling sofort bei der Keimung befällt, während der Zwergsteinbrand erst später vom Boden her an den Keimling herankommt. Offenbar ist das Mycel des gewöhnlichen Steinbrands dann schon so weit vorgedrungen, daß das Zwergsteinbrandmycel sich nicht mehr ge-

nügend entwickeln kann und vor allem die Sproßanlage nicht mehr erreichen kann.

Bezüglich des Einflusses der Düngung auf den gewöhnlichen Steinbrand finden sich die widersprechendsten Angaben. Nach ZILLIG (54) bleibt die künstliche Düngung in normalen Mengen ohne Wirkung, Thomasmehl begünstigte nach HEUSER (16) und RABIEN (35) den Steinbrand, ebenso Kali (HEUSER 16, HILTNER und LANG 17), während ihn Kalkstickstoff nach letzterem erheblich herabdrückt. Auch nach RADEMACHER (37) tötet Cyanamid Sporen von *Tilletia tritici* in vitro, am Weizenkorn und im Boden ab. Wie bereits erwähnt, hat sich leider die zunächst beobachtete Übereinstimmung des gewöhnlichen Steinbrands mit dem Zwergsteinbrand in der Empfindlichkeit gegen Kalkstickstoff in den Feldversuchen 1950/51 nicht bestätigen lassen.

In der Frage der Einwirkung des Wirtschaftsdüngers ist beim gewöhnlichen Steinbrand keineswegs der eindeutige begünstigende Einfluß wie beim Zwergsteinbrand nachzuweisen (ZILLIG 54, CASPAR 7, RIEHM 39). Nur aus der Praxis wird die befallserhöhende Wirkung berichtet (v. TUBEUF 46, 47, HAHNE 14).

Überhaupt keine klare Linie läßt sich bei den verschiedensten Forschern (VOLKART 48, HECKE 15, MÜLLER und MOLTZ 32, APPL 3, SESSOUS 44, HEUSER 16, CASPAR 7, RABIEN 35, BONNE 5, ZILLIG 54, FEUCHT 9, ROEMER und BARTHOLLY 42) über den Einfluß von Saatzeit, Witterung und Bodenfeuchtigkeit auf den Befall durch den Steinbrand erkennen. Es handelt sich hier offenbar um ein Ineinanderwirken der verschiedensten Faktoren, das eine Klärung dieser Fragen äußerst erschwert. Um so interessanter ist das Ergebnis der Untersuchung des Zwergsteinbrands in dieser Hinsicht, das doch wohl vermuten läßt, daß sich letzterer von dem gewöhnlichen Steinbrand in der Keimungsphysiologie und Infektionsart wesentlich unterscheidet.

## E. Bekämpfung des Zwergsteinbrands

### a) Kulturmaßnahmen

Es war klar, daß die Bekämpfung des Zwergsteinbrands bei der Kompliziertheit des ganzen Problems nicht sogleich in einer so einfachen und befriedigenden Form zu lösen sein würde, wie etwa mit der chemischen Beize beim gewöhnlichen Steinbrand. Doch ergaben die Versuche und Untersuchungen der letzten Jahre schon eine ganze Anzahl ohne weiteres durchführbarer Maßnahmen, bei deren Anwendung der Zwergsteinbrand stark herabgedrückt werden kann. Wenn er dadurch auch nicht vollständig unterdrückt wird, so stellt er doch keine ausgesprochene Gefahr mehr für den Weizen- und Dinkelanbau dar. Folgende Maßnahmen sind möglich:

1. An der Spitze dieser Kulturmaßnahmen steht der Anbau von Sommerweizen. Da dieser nicht befallen wird, ist es durch seinen Anbau auf jeden Fall möglich, den Zwergsteinbrand ganz zu vermeiden. Da aber aus Gründen der Arbeitsverteilung und aus Rücksicht auf den Ertrag ein ein-

seitiger Anbau von Sommerweizen nicht möglich ist, empfiehlt es sich, den Sommerweizen überall dorthin zu bringen, wo andere Faktoren, z. B. Vorfrucht oder Bodenreaktion, nicht ausreichend berücksichtigt werden können.

2. Besonderes Augenmerk ist auf die Vorfrucht zu richten. Es ist auf Grund der Untersuchungen erwiesen, daß Klee und andere Leguminosen hohe Befallsprozente zur Folge haben. Gerade im Falle einer solchen Vorfrucht ist es angebracht, den Winterweizen oder Dinkel durch Sommerweizen zu ersetzen, um auf der einen Seite nicht den Klee als gute Vorfrucht einzubüßen, andererseits aber der Gefahr durch den Zwergsteinbrand vorzubeugen.

3. Eine sehr wesentliche Möglichkeit, den Zwergsteinbrand einzudämmen, ist schließlich durch geschickte Handhabung der Handelsdünger gegeben. Als Stickstoffdüngemittel sollte unbedingt der Kalkstickstoff an erster Stelle stehen. Wenn auch seine zwergsteinbrandhemmende Wirkung noch nicht experimentell nachgewiesen werden konnte, so sprechen doch die praktischen Erfahrungen, sowie die Erfolge RADEMACHERS (37) mit Kalkstickstoff gegen eine Bodeninfektion durch *Tilletia tritici* durchaus für eine solche Wirkung. Die anderen Grundnährstoffe Phosphorsäure und Kali haben dagegen keinen wesentlichen Einfluß.

4. Ganz besonders muß aber auf die Anwendung der Wirtschaftsdünger hingewiesen werden. Auf der Alb werden nach alter Überlieferung Stallmist und Jauche zu Weizen und Dinkel gern direkt verabreicht. Es muß aber betont werden, daß gerade Stallmist und Jauche sehr zur Erhöhung des Zwergsteinbrandbefalls beitragen, wobei es gleichgültig ist, ob die Jauche im Frühjahr oder im Herbst gegeben wird. Hier sei nochmals darauf hingewiesen, daß auch der Schafpferch dieselbe zwergsteinbranderhöhende Wirkung wie der Stallmist hat, und daher ebenfalls von Weizen- und Dinkelfeldern wegbleiben muß.

5. Größere Schwierigkeiten macht in der Praxis die Forderung, das Saatgut möglichst spät einzubringen. Gerade auf der Alb sind dem Hinausschieben des Saattermins Grenzen gesetzt. Es ist unbedingt ein Risiko, trotz guten Saatwetters mit der Saat bis in den Oktober hinein zu warten. Es ist aber auf der anderen Seite ebenso ein Risiko, mit einer frühen Saat ein Zwergsteinbrandauftreten von 30 % oder mehr, wie es in den letzten Jahren beobachtet wurde, in Kauf zu nehmen. Im übrigen war in den Jahren 1948 und 1949 bei den spät gesäten Weizen- und Dinkelbeständen nie festzustellen, daß sie etwa schlechter durch den Winter gekommen wären als früh gesäte Bestände. Doch muß eingeräumt werden, daß die Winter in den beiden angeführten Jahren außerordentlich mild waren. Es ist anzuraten, auf keinen Fall vor Oktober zu säen. Besser sollte die Saat aber erst nach dem 10. Oktober erfolgen, da der Befall nach diesem Saattermin noch geringer ist.

### b) Sortenwahl

Es wäre sehr wünschenswert, wenn auch von seiten der Resistenzzüchtung eine wirksame Hilfe zur Bekämpfung des Zwergsteinbrands gebracht werden könnte. HOLTON und SUNESON (24) und RODENHISER und HOLTON

(41) sind in den Vereinigten Staaten, wie oben berichtet, diesem Problem nachgegangen und haben bereits ausreichendes Material für eine aussichtsreiche Kreuzung mit verschiedenen resistenten Sorten gesammelt.

Sehr viel schwieriger dürfte das Problem in Deutschland werden. Von den steinbrandresistenten deutschen Weizensorten hat sich bisher keine als völlig zwergsteinbrandresistent gezeigt. Auch die Dinkelsorten sind weder gegen den Steinbrand noch gegen den Zwergsteinbrand resistent. Dagegen blieben die amerikanischen Sorten Ridit und Hussar, wenigstens bisher, befallsfrei. Auch der Hohenheimer Stamm 29 hat bereits zwei Jahre hindurch keinen Zwergsteinbrand gezeigt.

Die Bekämpfung des Zwergsteinbrands durch Anbau resistenter Sorten wäre die sicherste, einfachste und billigste Methode, die Gefahr zu bannen, und sollte daher mit Nachdruck angefaßt werden.

### c) Anwendung chemischer Mittel

Da die Untersuchungen wohl einwandfrei ergeben haben, daß es sich bei der Infektion durch den Zwergsteinbrand um eine Bodeninfektion handelt, und da daher eine Saatgutbeizung mit Quecksilbermitteln in der bisherigen Form versagen mußte, schien es angebracht, eine Bekämpfung mit Bodendesinfektionsmitteln vorzunehmen.

Dazu wurden zunächst Versuche mit Brassicol — Wirkstoff Pentachlornitrobenzol — durchgeführt, indem 1949 an drei verschiedenen Stellen der Alb je eine Fläche von 72 qm mit 20 g/qm und mit 40 g/qm Brassicol (Farbwerke Hoechst) behandelt wurde. Das Brassicol wurde mit der Hand, als das Getreide noch offen in den Reihen lag, auf das Teilstück gestreut und sofort anschließend mit dem Saatgut eingeeggt. Eine gleichgroße Fläche wurde unbehandelt gelassen.

In allen drei Versuchen war weder in den mit 20 g/qm noch in den mit 40 g/qm behandelten Teilstücken eine kranke Pflanze zu finden, obgleich z. B. in Waldhausen das ganze Gebiet um die Teilstücke stark befallen war. Im Jahre 1949/50 wurden Versuche angelegt, um zu klären, wie weit man mit der Brassicolmenge heruntergehen kann. Es zeigte sich, daß fast für alle Weizensorten 5 g/qm (0,5 kg/a) ausreichend sind, während beim Dinkel Mengen von mindestens 10 bis 15 g/qm (1 bis 1,5 kg/a) für eine wirksame Bekämpfung nötig sind.

## Zusammenfassung

1. Etwa seit dem Jahre 1930 ist eine neuartige Steinbrandkrankheit, die durch Zwergwuchs der befallenen Halme und starke Bestockung gekennzeichnet ist, in Württemberg, Bayern und im Nordwesten der Vereinigten Staaten zu beobachten. Sie wird auf Grund des äußeren Erscheinungsbildes Zwergsteinbrand oder Kurzsteinbrand genannt.

2. Zweck der Arbeit war die Untersuchung der morphologischen und physiologischen Merkmale des Zwergsteinbrands, vor allem im Gegensatz zu den beiden Steinbrandarten *Tilletia tritici* (Bjerkander) Winter und *Tilletia foetens* (Berkeley et Curtis) Tulasne, sowie der Ökologie des Zwergsteinbrands. Hier waren es vor allem Boden, Saatgut, Vorfrucht, Düngung, Saatzeit und Witterung, deren Einflüsse auf den Zwergsteinbrand zu klären waren. Schließlich waren die systematische Einreihung und auch die Bekämpfungsmöglichkeiten zu überprüfen.

3. Die Chlamydosporen des Zwergsteinbrands ähneln in ihrer Form den Tilletia-Sporen. Die Netzleisten sind etwa doppelt so hoch wie bei *Tilletia tritici*. In der Größe unterscheiden sich die Zwergsteinbrandsporen nur unwesentlich von den gewöhnlichen Steinbrandsporen. Die Sporenfarbe variiert zwischen hellbraun und schwarzbraun. Eine abweichende Form der Chlamydosporen sind die sogenannten hyalinen Sporen. Sie wurden in einem Prozentsatz von 4,1 % (1948) und 7,9 % (1949) gefunden und sind z. T. nur halb so groß wie die normalen Zwergsteinbrandsporen, erreichen aber mitunter auch deren Größe. Es gibt hyaline Sporen mit einfacher und mit doppelt erscheinender Wandung ohne Netzleisten und solche, die mit den gleichen Netzleisten umzogen sind wie die gewöhnlichen Zwergsteinbrandsporen. Um alle Zwergsteinbrandsporen wurde eine gallertig durchsichtige Schicht beobachtet. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Schleimschicht.

Die Brandbutten der Zwergsteinbrandähren messen im Durchschnitt nur 3,3 × 3,2 mm gegen 4,8 × 3,6 mm bei gewöhnlichem Steinbrand. Das Gewicht von 100 Zwergsteinbrandbutten betrug 1,050 g gegenüber 1,950 g beim gewöhnlichen Steinbrand.

4. Variationsstatische Messungen über die Verzwergung ergaben eine Durchschnittsgröße der zwergsteinbrandkranken Halme von 31,60 cm, während die gesunden Halme im Durchschnitt eine Höhe von 92,15 cm erreichten. Der kürzeste Halm der verzwergten Pflanzen war 9 cm lang, der längste 74 cm. Die Variationskurven der Halmlänge von Zwergsteinbrand und gewöhnlichem Steinbrand überschnitten sich im Bereich zwischen 40 und 74 cm.

5. An zwergsteinbrandkranken Pflanzen wurde eine außerordentlich starke Bestockung mit bis zu 15 Halmen, bei einer durchschnittlichen Bestockungsstärke von 6,7 Halmen beobachtet. Teilbefall tritt beim Zwergsteinbrand erheblich öfter als beim gewöhnlichen Steinbrand auf.

6. Außer Weizen wurde auch der Dinkel stark befallen. Im Jahre 1948 wurde ein Übergreifen des Zwergsteinbrandes auf Roggen beobachtet.

7. Trotz zahlreicher Versuche, in denen vor allem auch die HOLTONschen Erfahrungen sowie die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen mit Wirtschaftsdünger und Bodenreaktion berücksichtigt wurden, gelang es nicht, eine nennenswerte Keimung der Sporen im Laboratorium zu erzielen.

8. Eine künstliche Saatgutinfektion konnte nicht erreicht werden. Dagegen wurde Zwergsteinbrandauftreten in mehreren Versuchen durch Bodeninfektion erzielt. In welchem Stadium und wie diese Infektion erfolgt, läßt sich noch nicht ersehen. Im Unterschied zum gewöhnlichen Steinbrand scheinen die Zwergsteinbrandsporen einer längeren Lagerungszeit im Boden zu bedürfen und längere Keimfähigkeit zu besitzen.

9. Ein wesentlicher Einfluß der Bodenart konnte nicht beobachtet werden. Doch scheint die Güte des Bodens insofern eine Rolle zu spielen, als besser mit Nährstoffen und mit Humus versorgte Böden einen höheren Befall zeigen. Der Zwergsteinbrand verträgt saure Bodenreaktion.

10. In allen Jahren waren jeweils die höchsten Lagen der Alb am stärksten befallen. Offenbar waren verschiedene Faktoren, die mit der Höhenlage verbunden waren, wie höhere Niederschlagsmenge, tiefere Temperatur, langsamer Pflanzenwuchs, saurere Bodenreaktion an diesem höheren Befall beteiligt.

11. Allgemein war der Befall am Feldrand am stärksten. Als mutmaßliche Ursache hierfür wird die dort geringere Bestandsdichte mit ihren Folgen erörtert.

12. Das Zwergsteinbrandauftreten in Württemberg wurde nur auf einem streng abgegrenzten Gebiet vom Nordrand der Alb bis hinunter auf etwa 540 m Höhe, in Oberschwaben auf zwei Befallsstellen bei Leutkirch und Waldsee festgestellt.

13. Eine Verschleppung des Zwergsteinbrands durch das Saatgut ist nicht festgestellt worden, ist aber wahrscheinlich.

14. Völlig zwergsteinbrandfrei blieben in eigenen Weizensortenversuchen der Jahre 1948/49 nur die amerikanischen Sorten Ridit und Hussar sowie der Hohenheimer Stamm 29.

Von den deutschen Sorten wurden am wenigsten Taca und Wahrberger Ruf befallen, doch reicht ihre Resistenz nicht aus. Alle untersuchten Dinkelsorten waren anfällig, am wenigsten noch die bodenständigen Steiners Roter Tiroler und Rechbergs Brauner und Früher Winterspelz.

15. Die Leguminosen üben als Vorfrucht einen stark befallserhöhenden Einfluß aus, wohl auf Grund ihrer Fähigkeit, Stickstoff zu sammeln. Die anderen Vorfrüchte unterscheiden sich kaum in ihrem Einwirken auf den Zwergsteinbrand.

16. Von den Handelsdüngern drückte im Jahr 1948/49 der Kalkstickstoff den Befall stärker herab, 1950/51 dagegen nicht. Die anderen Handelsdüngemittel hatten keinen merklichen Einfluß.

Sehr stark wirkten die Wirtschaftsdünger auf den Zwergsteinbrandbefall ein. Stallmist, Schafpferch und Jauche steigerten im Herbst oder Frühjahr (Jauche), unmittelbar zum Weizen oder Dinkel gegeben, die Befallsprozente erheblich.

Die starke Wirkung ist wohl nur zum geringeren Teil auf eine etwaige Verschleppung der Sporen durch die Wirtschaftsdünger zu erklären. Eher ist anzunehmen, daß die nachhaltig wirkende Stickstoffgabe die zwergsteinbrandkranken Pflanzen und Triebe in größerer Zahl zur Entwicklung gelangen läßt.

17. In den Jahren 1948 und 1949 wurde übereinstimmend beobachtet, daß der Befall um so geringer wurde, je später die Saatzeit lag.

18. Die Beizung mit quecksilberhaltigen Mitteln oder Formaldehyd verhindert den Zwergsteinbrandbefall nicht. Die Infektion geht daher offenbar nicht direkt von den am Korn haftenden Sporen aus.

19. Der gewöhnliche Steinbrand unterdrückt den Zwergsteinbrand. Daher tritt Zwergsteinbrand in gebeizten Beständen, mit Ausschaltung des gewöhnlichen Steinbrands, stärker auf als in ungebeizten Beständen.

20. Der Zwergsteinbrand ist nicht nur als bloße Rasse von *Tilletia tritici* anzusprechen. Eine Einreihung, zumindest als Unterform von *Tilletia tritici,* besser aber noch als eigene Art, scheint nach den vorliegenden Versuchen angezeigt, soll aber noch zurückgestellt werden.

21. Eine starke Einschränkung des Zwergsteinbrandbefalls kann durch Kulturmaßnahmen erreicht werden. So wird Sommerweizen im Gegensatz zum Winterweizen nicht befallen. Ferner ist die Vermeidung des Anbaus von Winterweizen oder Dinkel nach Leguminosen zu nennen. Von den Handelsdüngern ist Kalkstickstoff zu bevorzugen. Jegliche direkte Gabe von Wirtschaftsdünger, ob Stallmist, Schafpferch oder Jauche, ist auf jeden Fall zu unterlassen. Das Saatgut muß gute Triebkraft besitzen. Vor allem aber ist ein später Saattermin zur Herabsetzung des Befalls wichtig.

22. Weniger anfällige Sorten sind im Anbau zu bevorzugen. Die Zucht von zwergsteinbrandresistenten Weizen- oder Dinkelsorten, gegebenenfalls durch Einkreuzung amerikanischer resistenter Sorten, scheint aussichtsreich.

23. Eine Bekämpfung des Zwergsteinbrands durch Gaben von Brassicol war 1949 und 1950 erfolgreich, wobei im Jahre 1950 für Weizen 0,5 bis 1 kg/a für Dinkel 1 bis 1,5 kg/a Brassicol genügten.

## Literaturverzeichnis

1. Aamodt, O. S., Torrie, J. H. and Takahashi: The effect of several collections of *Tilletia tritici* and *Tilletia levis* on the morphology of spring wheats. Phytopathology **26**, 1936, 344—359.

2. Appel, O. und Gassner, G.: Untersuchungen über den Brand. Mittlg. Biol. Reichsanst. **4**, 1907, 9—14.

3. APPL, JOHANN: Saatzeit und Steinbrandbefall des Weizens. Zeitschr. f. d. landwirtsch. Versuchswesen in Österreich. **18**, 1915, 45—54.

4. BAMBERG, R. H., HOLTON, C. S., RODENHISER, H. A. and WOODWARD, R. W.: Wheat dwarf bunt depressed by common bunt. Phytopathology **37**, 1947, 556—560.

5. BONNE, C.: Untersuchungen über den Steinbrand des Weizens. Angew. Botanik **13**, 1931, 169—209.

6. BREFELD, O.: Untersuchungen auf dem Gesamtgebiet der Mykologie. 5. Heft: Die Brandpilze. Leipzig 1883.

7. CASPAR, R.: Über den Einfluß äußerer Faktoren auf den Steinbrandbefall des Weizens. Kühn-Archiv **12**, 1926, 205—256.

8. ELLENBERG, H.: Unkrautgesellschaften als Maß für Säuregrad, die Verdichtung und andere Eigenschaften des Ackerbodens. Sonderdruck aus „Berichte über Landtechnik" Heft 4, „Bodenbearbeitung als Kernproblem der Bodenfruchtbarkeit".

9. FEUCHT, W.: Die Wirkung des Steinbrands *(Tilletia tritici* und *Tilletia foetens)* auf verschiedene Winterweizensorten bei künstlicher Infektion in ihrer Abhängigkeit von äußeren Faktoren. Phytopath. Zeitschr. **4**, 1932, 247—290.

10. FITTSCHEN, H. H.: Weitere Beiträge zur Züchtung steinbrandresistenter Weizensorten. Phytopath. Zeitschr. **12**, 1940, 169—218.

11. FUCHS, W. H.: Der Zwergsteinbrand des Weizens. „Ztschr. für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz" **55**, 1948, 236—238.

12. GASSNER, G.: Über Auftreten und Verbreitung von *Tilletia tritici* und *Tilletia foetens* in der Türkei. Phytopath. Ztschr. **11**, 1938, 469—488.

13. — —: Untersuchungen über Keimgeschwindigkeit und Infektionsvermögen verschiedener Stämme von *Tilletia foetens* und *Tilletia tritici.* Phytopath. Ztschr. **11**, 1938, 489—516.

14. HAHNE, JOS.: Untersuchungen über Keimungsbedingungen von Tilletiasporen. Kühn-Archiv **9**, 1925, 157—263.

15. HECKE, L.: Der Einfluß von Sorte und Temperatur auf den Steinbrandbefall. Ztschr. f. d. Landwirtsch. Versuchswesen in Österreich **12**, 1909, 49—66.

16. HEUSER, W.: Versuche über den Einfluß äußerer Bedingungen auf die Stärke des Steinbrandbefalls beim Weizen. Frühlings Landwirtsch. Ztg. **71**, 1922, 81.

17. HILTNER, L. und LANG, W.: Über den Einfluß der Düngung, insbesondere mit Kalkstickstoff, auf die Stärke des Brandbefalls des Getreides. Mitt. D. L. G. **37**, 1922, 253.

18. HIRLING, W.: Feldrandschäden. Eine Studie über die an Feldrändern auftretenden Mindererträge durch nichtparasitäre Störungen, Pflanzenkrankheiten, Schädlinge und Unkräuter. Dissertation Hohenheim 1949.

19. HOLTON, C. S.: Preliminary investigations on dwarf of wheat. Phytopathology **31**, 1941, 74—82.

20. — —: Chlamydospore germination in the fungus causing dwarf bunt of wheat. Phytopathology **33**, 1942, 232—235.

21. — —: Inheritance of chlamydospore and sorus characters in the species and race hybrids of *Tilletia caries* and *Tilletia foetida.* Phytopathology **34**, 1944, 586—592.

22. — —, BAMBERG, R. H. and WOODWARD, R. W.: Progress in the study of dwarf bunt of winter wheat in the pacific northwest. Phytopathology **39**, 1949, 986—1000.

23. — — and HEALD, F. D.: Studies on the control and other aspects of bunt of wheat. Wash. Agr. Exp. Stat. Bull. **339**, 1936.

24. — — and Suneson, C. A.: Wheat varietal reaction to dwarf-bunt in the western wheat region. Journ. Am. Soc. Agron. **35**, 1943, 579—583.

25. v. Kirchner, O.: Untersuchungen über die Empfänglichkeit unseres Getreides für Brand- und Rostkrankheiten. Frühlings Landwirtsch. Ztg. **65**, 1916, 1—27, 41—72, 92—137.

26. Knorr, C.: Untersuchungen über das Verhalten von Sommerweizensorten und -kreuzungen bei künstlicher Infektion mit Steinbrand *(Tilletia tritici)*. Ztschr. f. Pflanzenzüchtung **14**, 1939, 261—310.

27. Koudelka, H.: Neue Probleme in der Brandpilzfrage. Blätter für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung **11**, 1933, 28—29.

28. Kühn, J.: Über die Art des Eindringens des Steinbrands. Biedermanns Zentralbl. **5**, 1874, 150.

29. — —: Beobachtungen über den Steinbrand des Weizens. Österreich. Landwirtsch. Wochenbl. 1880, 2.

30. Lang, W.: Über die Beeinflussung der Wirtspflanze durch *Tilletia tritici*. Ztschr. Pflanzenkrankh. **27**, 1917, 80—99.

31. Michalowska, A.: Die Gasdesorptionsmethode des Beizens von Hafer, Gerste und anderen Getreidearten.

32. Müller, H. C. und Molz, E.: Über den Steinbrand des Weizens. Frühlings Landwirtsch. Ztg. **63**, 1914, 204—214.

33. Pichler, J.: Über Roggensteinbrand *(Tilletia tritici* f. sp. *secalis)*. Pflanzenschutz-Berichte **5/6**, 1950, 273—286.

34. Potter, A. A. and Coons, G. W.: Differences between the species of *Tilletia* on wheat. Phytopathology **8**, 1918, 106—113.

35. Rabien, H.: Über Keimungs- und Infektionsbedingungen von *Tilletia tritici*. Arb. Biol. Reichsanst. **15**, 1927, 297—353.

36. Rademacher, B.: Ungewöhnliche Dürreschäden bei Winterweizen. Schwäbischer Bauer **42**, 1949, 6.

37. — —: Über die fungistatische und fungizide Wirkung des Cyanamids am Beispiel des Weizensteinbrands *(Tilletia tritici* [Bjerk] Winter). Phytopath. Zeitschr. **17**, 1951, 353—373.

38. — —: Gegen den Weizensteinbrand. Umschau in Wissenschaft und Technik **19**, 1951.

39. Riehm, E.: Über die Keimungs- und Infektionsbedingungen der Sporen von *Tilletia tritici*. Mitt. Biol. Reichsanst. **18**, 1920, 20—23.

40. — —: Pflanzenschutzpraktikum Berlin 1931.

41. Rodenhiser, H. A. and Holton, C. S.: Distribution of races of *Tilletia caries* and *Tilletia foetida* and their relative virulence on certain varieties and selections of wheat. Phytopathology **35**, 1945, 955—969.

42. Roemer, Th. und Bartholly, R.: Die Aggressivität verschiedener Steinbrandherkünfte *(Tilletia tritici)* und ihre Veränderungen durch die Wirtssorte. Phytopath. Zeitschr. **6**, 1933, 469—506.

43. Savulescu, T.: Das Vorkommen und die Verbreitung der in Rumänien den Weizensteinbrand hervorbringenden *Tilletia*-Arten. Phytopath. Zeitschr. **14**, 1944, 148—185.

44. Sessous, G.: Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten durch züchterische Maßnahmen. Mitt. D. L. G. **36**, 1921, 632.

45. Tillet: Dissertation sur la cause qui corrompt et noircit les grains de blé dans épis et sur les moyens de prevenir ces accidents. Bordeaux 1755.

46. v. Tubeuf, C.: Studien über die Brandkrankheiten des Getreides und ihre Bekämpfung. Mitt. Biol. Reichsanst. **2**, 1901, 179—372.

47. — —: Weitere Beiträge zur Kenntnis der Brandkrankheiten des Getreides und ihre Bekämpfung. Mitt. Biol. Reichsanst. **2**, 1902, 437—467.

48. Volkart, A.: Die Bekämpfung des Steinbrands des Weizens und des Kornes. Landw. Jahrb. d. Schweiz **20**, 1906, 445—490.

49. Wagner, F.: Über das Auftreten von Zwergsteinbrand in Bayern. Pflanzenschutz **1**, 1948, 1—2.

50. — —: Diskussionsbemerkungen auf der Pflanzenschutztagung in Rothenburg o. d. T., September 1948.

51. — —: Auftreten, Sporenkeimung und Infektion des Zwergsteinbrands an Weizen. Pflanzenbau und Pflanzenschutz **1**, 1950, 1—13.

52. Warmbrunn, K.: Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. Dissertation Hohenheim 1950.

53. Young, P. A.: A new variety of *Tilletia tritici* in Montana. Phytopathology **25**, 1935, 40.

54. Zillig, H.: Ustilaginales (Brandpilze). Handbuch der Pflanzenkrankheiten von Sorauer, 3. Bd., „Die pflanzlichen Parasiten". 134—281.

# Kurze Mitteilungen

*Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule in Zürich*
*Direktor: Professor Dr. Ernst Gäumann*

## Über Stoffwechselprodukte bei *Botrytis cinerea* Pers.

Von
W. Sauthoff

Versuche zum Problem der induzierten Abwehrreaktionen zeigten die Notwendigkeit auf, die zur Vakzination gelangenden Kulturfiltrate hinsichtlich ihrer Toxizität genau zu definieren. Dafür die Grundlage zu schaffen, ist Aufgabe dieser Untersuchung.

*Botrytis cinerea* Pers. (isoliert von *Citrus sinensis*) wurde in 100 ml-Erlenmeyerkolben auf Fries II-Nährlösung + 100 γ/l Aneurin + 0,1 % Agar kultiviert. Mit 30 ml Nährlösung gefüllt wurden die Kolben im Autoklaven sterilisiert und einen Tag später mit 1 ml einer Konidiensuspension von der Dichte 200 000/ml beimpft. Die Inkubation erfolgte in einem dunklen Raum bei 24 ° C.

Abgeschnittene Sprosse von *Pisum sativum* L. und *Helxine soleirolii* Req. zeigen nach Aufnahme von Kulturfiltrat scharf umrissene Nekrosen. Auch die Stengel werden geschädigt. Die Kontrollen bleiben nach Aufnahme gleicher Mengen reiner Nährlösung symptomlos. Zur quantitativen Erfassung des damit nachgewiesenen toxischen Prinzips wurde an Helxine ein Test ausgearbeitet. Die Applikation des Kulturfiltrates erfolgt dabei mit Hilfe der Vakuuminfiltrationsmethode. Im Verlauf einer Kulturperiode wird das Maximum der Toxizität unter den oben angegebenen Versuchsbedingungen in der Regel nach fünf Tagen erreicht.

Mit dem Ziel, eine der einfacheren mikrobiologischen Testmethoden zur Anwendung zu bringen, wurden gegen Helxine aktive Kulturfiltrate von *Botrytis cinerea* auf antifungische Wirksamkeit hin untersucht. Dabei konnte ein die Keimung von *Ustilago zeae* (Beckm.) Ung. hemmendes Prinzip festgestellt werden, dessen quantitativer Nachweis im Sporenkeimungstest, in enger Anlehnung an die bei Blumer und Kundert (1950) und Kobel (1951) angegebene Technik, mit relativ großer Genauigkeit möglich ist.

Das gegen Helxine wirksame und das antifungische Prinzip scheinen nach den bisher vorliegenden Ergebnissen identisch zu sein, doch sind weitere Versuche notwendig, um diese Frage mit Sicherheit entscheiden zu können.

Die Toxizität des Kulturfiltrates gegenüber *Ustilago zeae* steht zur Inkubationszeit in folgender Beziehung: Zwei Tage nach der Impfung ist noch keine Aktivität nachzuweisen, nach vier Tagen hat die Testlösung 50 bis 80 Einheiten und nach fünf Tagen wird mit 150 bis 200 Einheiten die größte Toxizität erreicht. Dann fällt die Aktivitätskurve steil ab (nach sechs Tagen 0 bis 20 Einheiten, nach sieben Tagen 0 Einheiten). Gleichzeitig durchgeführte Myzeltrockengewichtsbestimmungen zeigten in allen bisherigen Versuchen, daß das Maximum der Toxinproduktion und das Maximum des Myzelzuwachses zeitlich zusammenfallen. Das wirksame Prinzip dürfte also wohl kaum ein Zersetzungsprodukt des Myzels sein.

Das pH der Nährlösung (pH 5,5) sinkt nach der Impfung stetig ab, erreicht nach vier bis fünf Tagen ein Minimum (pH 4,0 bis 4,5) — also kurz vor oder im Maximum der Toxizität — und steigt dann steil an. Auf Grund der bisherigen Versuche erscheint diese Korrelation jedoch nicht sicher genug, um die Schlußfolgerung eines stofflichen Zusammenhangs zu rechtfertigen, zumal andere hier noch nicht referierte Ergebnisse durchaus dagegen sprechen. Die Möglichkeit eines pH-Einflusses auf den Wirkungsgrad des toxischen Prinzips wird durch sehr starke Pufferung der Testlösung ausgeschieden.

Durch stalagmometrische Messungen wurde nachgewiesen, daß Stoffwechselprodukte des Pilzes die Oberflächenspannung des Kulturfiltrates gegen Luft um 10 bis 15 dyn/cm — bezogen auf die Kapillarkonstante reiner Nährlösung — herabsetzen. Dabei fällt auf, daß in allen bisherigen Versuchen im Verlauf einer Kulturperiode das Maximum der Verminderung der Oberflächenspannung/Zeiteinheit und die Maxima des Myzelzuwachses und der Toxinproduktion zusammenfallen. Dennoch sind das gegenüber *Ustilago zeae* wirksame und das die Oberflächenaktivität verändernde Prinzip nicht identisch, denn im darauffolgenden Kulturabschnitt klaffen die Kurven auseinander: die Filtrate verlieren ihre antifungische Wirksamkeit, bleiben aber oberflächenaktiv. Ob die beiden Prinzipien hinsichtlich der Toxizität in synergistischem Sinne wirken, wird gegenwärtig untersucht.

## Literaturverzeichnis

Blumer, S. und Kundert, J., 1950. Methoden der biologischen Laborprüfung von Kupferpräparaten. Phytopath. Zeitschr. **17**, 161—199.

Kobel, F., 1951. Untersuchungen über toxische Stoffwechselprodukte von *Nectria cinnabarina* (Tode) Fr. Phytopath. Zeitschr. **18**, 157—195.

BAND 19, HEFT 1 APRIL 1952

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Appel-Berlin, Prof. Dr. E. Baldacci-Mailand, Prof. Dr. H. Braun-Bonn, Prof. Dr. W. B. Brierley-Reading, Prof. Dr. Takewo Hemmi-Kyoto, Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler-Celle, Prof. Dr. K. O. Müller, Cambridge, Prof. Dr. H. M. Quanjer-Wageningen, Prof. Dr. Tr. Savulescu-Bukarest, Prof. Dr. E. C. Stakman-St. Paul

*herausgegeben von*

Prof. Dr. Dr. h. c. **G. Gassner** und Prof. Dr. **E. Gäumann**
Braunschweig Zürich

Mit 42 Abbildungen

1952

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 19,* Heft 1, *S. 1—128, Berlin 1952*

# INHALT

**Abhandlungen**


Cipriani, P. L., Affinità e disformità tra neoproduzioni vegetali da *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn. e tumori umani rilevate attraverso indagini cito-chimiche. (4 Fig.) ..... 1

Stapp, C. und Freter, R., Untersuchungen über die Wirkung von 2,4 D im Boden. II. Mitteilung. (Mit 1 Abb.) ..... 20

Rüdiger, W., Zur pathologischen Anatomie des Leins, *Linum usitatissimum* L. (Mit 10 Abb.) ..... 34

Fürst, H., Untersuchungen über die Wirkungen von hochmolekularen organischen Stoffen als Spritzmittel gegen Rostpilzinfektion ..... 48

Hassebrauk, K., Untersuchungen über die Einwirkung von Sulfonamiden und Sulfonen auf Getreideroste. III. (Mit 1 Abb.) ..... 56

Herold, F., Untersuchungen zur Rettichschwärze und zur Biologie ihres Erregers *Aphanomyces raphani* Kendr. im Vergleich mit weiteren *Aphanomyces*-Arten. (Mit 25 Abb.) ..... 79

Landolt, E., Über Welkestoffbildung bei *Fusarium culmorum* (W. G. Sm.) Sacc. (Mit 1 Abb.) ..... 126


---


**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Schriftleitung:** Prof. Dr. Dr. h. c. Gassner, Braunschweig, Humboldtstr. 1 und Prof. Dr. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2.
Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47 oder an die Herausgeber: für Arbeiten aus Deutschland und Österreich an Prof. Gassner, für Arbeiten aus anderen Ländern an Prof. Gäumann.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. Gassner, Braunschweig. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Gassner vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen sind honorarfrei.
Honorar für die „Besprechungen" 48,— DM je Druckbogen.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 6 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Bogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 2,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich.
Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.


---


**Abonnementspreis dieses Heftes 21,80 DM** **Einzelpreis 22,80 DM**

**R. FRIEDLÄNDER & SOHN**
*Antiquariat für Naturwissenschaften (seit 1828)*
**Berlin-Charlottenburg 2, Knesebeckstraße 15**

**kauft ständig** Bibliotheken und Einzelwerke aus den Gebieten: Ornithologie · Botanik · Zoologie · Geologie · Geographie · Entomologie · Reisen · Mathematik · Astronomie und Landwirtschaft
*Antiq.-Kat. uns. Lagers a.o. Gebieten stehen teilweise zur Verfügung*

*Soeben erschien:*

PAUL SORAUER

# Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Herausgegeben von
Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. h. c. Dr. O. APPEL und Prof. Dr. H. BLUNCK

Sechster Band: **Pflanzenschutz**
Verhütung und Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten

*Zweite neubearbeitete Auflage, 1. Lieferung, 464 Seiten, Ganzleinen geb. 78,— DM*

INHALT:

Ober-Reg.-Rat Prof. Dr. H. MORSTATT, Die wirtschaftliche Bedeutung des Pflanzenschutzes.
Prof. Dr. H. BRAUN, Die Verhütung des Auftretens von Pflanzenkrankheiten und -schädlingen (Hygiene). Kulturmaßnahmen — Standortberücksichtigung — Standortverbesserung — Die Pflanze als unmittelbares Objekt hygienischer Kulturmaßnahmen.
Prof. Dr. H. W. FUCHS, Bodenentseuchung auf biologischem Wege, auf physikalischem Wege, mit chemischen Mitteln.
Prof. Dr. Dr. h. c. G. GASSNER, Beizung und Entseuchung von Saat- und Pflanzgut.
Prof. Dr. H. BRAUN, Absperrmaßnahmen (Quarantäne).

Die 2. Lieferung der 2. Auflage von Band VI wird zum Inhalt haben:
Die Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten und Schädlinge

Das „Handbuch der Pflanzenkrankheiten" von Sorauer ist das für die Bodenkultur als Handbuch der Pflanzenhygiene grundlegende und in der ganzen Welt maßgebende wissenschaftliche Standardwerk der Pflanzenkrankheiten und des Pflanzenschutzes. Es ist zugleich für die gesamte Weltliteratur das einzige umfassende Handbuch seines Gebietes, das für jeden, der sich auf wissenschaftlicher Grundlage mit Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz beschäftigt, wirklich unentbehrlich ist.

*Die Bestellung der 1. Lieferung verpflichtet zur Abnahme der folgenden Lieferungen des 1. Halbbandes von Band VI.*

---

Aufforderung zur Subskription:

*Als Sonderdruck erscheint voraussichtlich August* **1952**

# Literatur zur HCH- und Diën-Gruppe. Liste III

Von Dr. H. RIEMSCHNEIDER und ELISABETH SCHÖLZEL
*kartoniert etwa 140 Seiten im Format der „Zeitschrift für angewandte Entomologie"*
*Subskriptionspreis 22,— DM*

Die wertvolle Arbeit erschien in ihrem ersten Teil soeben in Heft 3 (Bd. 33) der „Zeitschrift für angewandte Entomologie". Sie soll in ihrer Gesamtheit das von ihren Verfassern bis Juli 1951 registrierte Literaturmaterial über die Insektizide der HCH- und Diën-Gruppe einem größeren Kreis von Interessenten zugänglich machen. Sie bringt über 3000 Titel mit Angaben von Referaten sowie von Arbeitsschwerpunkten und behandelten Insektizid-Gruppen.

*Wir laden Sie hiermit zur Subskription ein und bitten um baldmöglichste Aufgabe Ihrer Bestellung. Mit Erscheinen des Sonderdruckes erlischt der ermäßigte Subskriptionspreis. Der Ladenpreis beträgt dann 25,— DM*

VERLAG PAUL PAREY

*Soeben erschien:*

# Angewandte Botanik

Zeitschrift der Vereinigung für angewandte Botanik e. V., Berlin-Dahlem,

Herausgegeben im Auftrage der Vereinigung
von Dr. K. HASSEBRAUK

*Band XXVI, Heft 2, 144 S. m. 14 Abb. und 13 Tabellen, kart. 9,— DM*

Aus dem Inhalt:

G. GASSNER, Zur Frage der Übertragung von *Cercospora beticola* durch das Rübensaatgut
G. GASSNER und H. GRIMM, Über die Wirkung von Kupferkalkspritzungen auf Ertrag und Stärkegehalt der Kartoffeln
B. RADEMACHER und J. OZELINS, Einfluß der Getreidekonkurrenz und des Nährstoffgehalts im Keimsubstrat auf Keimung und Jugendentwicklung verschiedener Unkräuter
E. FRÖMMING, Neuere Erkenntnisse über unsere Nacktschnecken als Schädlinge
W. TRAPPMANN, Zur Frage der Schneckenbekämpfung
W. MÜLLER, Der Einfluß von Licht, Temperatur und Substrat auf die Keimung von Samen einiger Brassica-Arten

Als erstes Heft nach dem Kriege erschien September 1951 Band XXVI, Heft 1. Weitere Hefte erscheinen in zwangloser Folge und werden einzeln berechnet.

Auslieferung durch:
VERLAG PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG
Berlin SW 68 (Westberlin), Lindenstraße 44/47

---

# Nematoden der Kulturpflanzen Europas

Von Dr. H. GOFFART
Leiter des Instituts für Hackfruchtbau der Biologischen Bundesanstalt Münster i. W.

*144 Seiten mit 91 Textabb., Ganzl. geb. 18,— DM*

Das Buch stellt die modernste und umfassendste deutschsprachige Veröffentlichung auf dem Gebiet der Nematodenforschung dar. Praxis und Wissenschaft erhalten durch dieses auf Grund jahrzehntelanger Beobachtungen aufgebaute Werk eine klare Übersicht über die wichtigsten Arten der Nematoden und die durch sie hervorgerufenen Schäden an den verschiedenen Kulturpflanzen

„So sind Gründlichkeit, klarer und übersichtlicher Aufbau ein Kennzeichen dieses Buches, das den Niederschlag der 25 jährigen Forschungsarbeit und praktischen Erfahrung eines unserer besten Nematodenspezialisten darstellt".
(„Nachrichtenblatt des deutschen Pflanzenschutzdienstes", Braunschweig, Juni 1951.)

Die modernste Bearbeitung der Waldkrankheitslehre

# Grundriß der Forstpathologie

Von Prof. Dr. FRITZ SCHWERDTFEGER

*210 Seiten mit 139 Textabbildungen. Ganzleinen gebunden 13,60 DM.*

Dieser Grundriß gibt einen erschöpfenden Überblick über die Grundtatsachen der Waldkrankheitslehre und macht mit den wirtschaftlich wichtigen Krankheiten und Schädigungen des Waldes sowie ihrer Verhütung und Bekämpfung bekannt.

Dem Forstmann wie dem Phytopathologen, dem Botaniker wie dem Zoologen, dem Chemiker wie dem Bodenkundler werden über die geradezu stürmisch verlaufende Entwicklung dieses Arbeitsgebietes auf Grund neuester wissenschaftlicher Erkenntnisse erstmalig die allgemeinen Zusammenhänge und die sich ergebenden Nutzanwendungen vor Augen geführt.

VERLAG PAUL PAREY

---

Verlag Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstraße 44-47 (West-Berlin). Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Gassner (20 b) Braunschweig, Humboldtstraße 1 und Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben. Berlin SO 36 (West-Berlin). Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten. Erscheinungsweise: Jährlich 6 Hefte (4 Hefte = 1 Band).

BAND 19, HEFT 2 JUNI 1952

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Appel-Berlin, Prof. Dr. E. Baldacci-Mailand, Prof. Dr. H. Braun-Bonn, Prof. Dr. W. B. Brierley-Reading, Prof. Dr. Takewo Hemmi-Kyoto, Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler-Celle, Prof. Dr. K. O. Müller-Cambridge, Prof. Dr. H. M. Quanjer-Wageningen, Prof. Dr. Tr. Savulescu-Bukarest, Prof. Dr. E. C. Stakman-St. Paul

*herausgegeben von*

Prof. Dr. Dr. h. c. **G. Gassner** Braunschweig und Prof. Dr. **E. Gäumann** Zürich

Mit 63 Abbildungen

1952

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 19,* **Heft 2,** *S. 129—268, Berlin 1952*

# INHALT

**Abhandlungen**


Wilhelm, A. F., Bormangel bei der Weinrebe *Vitis vinifera* L. (Mit 21 Abb.) .. 129

Gäumann, E., Naef-Roth, St., Reusser, P. und Ammann, A., Über den Einfluß einiger Welketoxine und Antibiotica auf die osmotischen Eigenschaften pflanzlicher Zellen. (Mit 25 Abb. und 11 Tab.) ..... 160

Reusser, P., Über den Einfluß von Patulin auf den Gaswechsel der Hefezellen. (Mit 17 Abb.) ..... 221

**Besprechungen** ..... 266


---

**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Schriftleitung:** Prof. Dr. Dr. h. c. Gassner, Braunschweig, Humboldtstr. 1 und Prof. Dr. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2.
Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47 oder an die Herausgeber: für Arbeiten aus Deutschland und Österreich an Prof. Gassner, für Arbeiten aus anderen Ländern an Prof. Gäumann.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. Gassner, Braunschweig. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Gassner vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen sind honorarfrei.
Honorar für die „Besprechungen" 48,— DM je Druckbogen.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 8 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Bogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 2,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich.
Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

---


**Abonnementspreis dieses Heftes 23,40 DM** **Einzelpreis 25,40 DM**

Im nächsten Heft kommen folgende Arbeiten zum Abdruck:

M. Klinkowski und H. A. Uschdraweit, Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate, eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit.

E. Köhler, Die Bukettkrankheit, eine Viruskrankheit der Kartoffel.

E. Köhler, Beiträge zur Kenntnis des A-Virus der Kartoffel.

F. L. M. Turel, Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr.

E. Müller und W. Biedermann, Der Einfluß von $Cu^{+2}$-Ionen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis*.

H. Kern, Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*.

---


## Gesunder und kranker Boden

Ein praktischer Wegweiser zur Gesunderhaltung des Ackers

Von Prof. Dr. F. SEKERA

Bodenbiologisches Institut Wien

*1951. 3. neubearbeitete Auflage. 95 Seiten mit 39 Textabbildungen. Kart. 5,80 DM*

Ausgehend von der Pionierarbeit J. Görbings bringt der Autor in der vollständig neubearbeiteten Auflage seines Buches viel Neues aus seiner eigenen Forschungsarbeit und gibt uns einen anschaulichen Querschnitt des heutigen Wissens um die Erhaltung der Bodenfruchtbarkeit. Hier spricht ein mit der Praxis eng verbundener Wissenschaftler und vermittelt uns Einblicke in den Boden, die bisher nur der Forscher hatte. Er verhilft dem Landwirt dazu, seinen eigenen Acker zu beobachten, seine Naturgesetze zu verstehen und als Techniker verwaltend einzugreifen. Natur und Technik werden eins! Wie beide einander helfen müssen, um die Bodengare wieder zu gewinnen und dauernd zu erhalten, wird an Hand sorgfältig ausgewählter Bilder mit einfachen Worten jedermann verständlich. Im Sinne des vom Autor im Jahre 1943 begründeten Bodengesundheitsdienstes bedeutet dieses Buch zweifellos einen weiteren Aufbau und Fortschritt.

---

## Nematoden der Kulturpflanzen Europas

Von Dr. H. GOFFART

Regierungsrat
Leiter des Instituts für Hackfruchtbau der Biologischen Bundesanstalt Münster i. W.

*1951. 144 Seiten mit 91 Textabbildungen. Ganzleinen geb. 18,— DM*

Die Kenntnis von den pflanzenparasitischen Nematoden hat im Laufe der letzten Jahrzehnte einen gewaltigen Aufschwung genommen. Die vorliegende interessante Neuerscheinung gibt hervorragende Möglichkeiten, sich über den Stand der Forschung auf diesem Gebiet zu informieren. Dem Phytopathologen wie dem Botaniker, dem Zoologen und Bodenkundler wird ein ausgezeichneter Einblick in ein wichtiges Teilgebiet der angewandten Wissenschaft vermittelt.

VERLAG PAUL PAREY

*Soeben erschien:*

PAUL SORAUER

# Handbuch der Pflanzenkrankheiten

Herausgegeben von
Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. h. c. Dr. O. APPEL und Prof. Dr. H. BLUNCK

Sechster Band: **Pflanzenschutz**
Verhütung und Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten

*Zweite neubearbeitete Auflage, 1. Lieferung, 464 Seiten, Ganzleinen geb. 78,— DM*

INHALT:

Prof. Dr. H. MORSTATT, Die wirtschaftliche Bedeutung des Pflanzenschutzes.
Prof. Dr. H. BRAUN, Die Verhütung des Auftretens von Pflanzenkrankheiten und -schädlingen (Hygiene). Kulturmaßnahmen — Standortberücksichtigung — Standortverbesserung — Die Pflanze als unmittelbares Objekt hygienischer Kulturmaßnahmen.
Prof. Dr. H. W. FUCHS, Bodenentseuchung auf biologischem Wege, auf physikalischem Wege, mit chemischen Mitteln.
Prof. Dr. Dr. h. c. G. GASSNER, Beizung und Entseuchung von Saat- und Pflanzgut.
Prof. Dr. H. BRAUN, Absperrmaßnahmen (Quarantäne).

Die 2. Lieferung der 2. Auflage von Band VI wird zum Inhalt haben:
Die Bekämpfung der Pflanzenkrankheiten und Schädlinge

Das „Handbuch der Pflanzenkrankheiten" von Sorauer ist das für die Bodenkultur als Handbuch der Pflanzenhygiene grundlegende und in der ganzen Welt maßgebende wissenschaftliche Standardwerk der Pflanzenkrankheiten und des Pflanzenschutzes. Es ist zugleich für die gesamte Weltliteratur das einzige umfassende Handbuch seines Gebietes, das für jeden, der sich auf wissenschaftlicher Grundlage mit Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz beschäftigt, wirklich unentbehrlich ist.

*Die Bestellung der 1. Lieferung verpflichtet zur Abnahme der folgenden Lieferungen der 2. Auflage von Band VI.*

---

*Soeben erschien:*

# Mitteilungen aus der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft

**Berlin-Dahlem**

Herausgegeben von der
Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem
in Gemeinschaft mit der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig

Heft 74: **Pflanzenschutztagung der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig in Würzburg 23. bis 25. Oktober 1951**

*168 Seiten mit 31 Abbildungen, brosch. 20,— DM.*

Dieses Heft ist wie auch die nach dem Kriege erschienenen Veröffentlichungen der Biologischen Zentralanstalt Berlin-Dahlem (Heft 68 bis 73) im Buchhandel nur durch den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68 (Westberlin), Lindenstraße 44/47, zu beziehen.

VERLAG PAUL PAREY

Verlag Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstraße 44-47 (West-Berlin). Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Gassner, (20 b) Braunschweig, Humboldtstraße 1 und Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Printed in Germany. Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36 (West-Berlin). Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten. Erscheinungsweise: Jährlich 8 Hefte (4 Hefte = 1 Band).

BAND 19, HEFT 3 JULI 1952

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Appel-Berlin, Prof. Dr. E. Baldacci-Mailand, Prof. Dr. H. Braun-Bonn, Prof. Dr. W. B. Brierley-Reading, Prof. Dr. Takewo Hemmi-Kyoto, Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler-Celle, Prof. Dr. K. O. Müller-Cambridge, Prof. Dr. H. M. Quanjer-Wageningen, Prof. Dr. Tr. Savulescu-Bukarest, Prof. Dr. E. C. Stakman-St. Paul

*herausgegeben von*

Prof. Dr. Dr. h. c. **G. Gassner** und Prof. Dr. **E. Gäumann**
Braunschweig Zürich

Mit 45 Abbildungen

1952

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 19,* Heft 3, *S. 269—388, Berlin 1952*

# INHALT

Abhandlungen


Klinkowski, M., Uschdraweit, H. A., Die Bronzefleckenkrankheit der Tomate, eine bisher in Deutschland noch nicht beobachtete Viruskrankheit. (Mit 4 Abb.) 269

Köhler, E., Die Bukettkrankheit, eine Viruskrankheit der Kartoffel. (Mit 16 Abb.) 284

Köhler, E., Beiträge zur Kenntnis des A-Virus der Kartoffel. (Mit 2 Abb.) .... 295

Turel, F., Der Einfluß von Aneurin und Zink auf das Wachstum und die Toxinproduktion von *Fusarium solani* (Mart.) App. et Wr. (Mit 15 Abb.) ..... 307

Müller, E. und Biedermann, W., Der Einfluß von $Cu^{+2}$-Ionen auf den Keimungsablauf von *Alternaria tenuis*. (Mit 3 Abb.) ..... 343

Kern, H., Über die Beziehungen zwischen dem Alkaloidgehalt verschiedener Tomatensorten und ihrer Resistenz gegen *Fusarium lycopersici*. (Mit 5 Abb.) .... 351

Bockmann H., Der Einfluß der Stickstoffdüngung auf die Halmbruchkrankheit (Lagerfußkrankheit) des Weizens. ..... 383


---


**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Schriftleitung:** Prof. Dr. Dr. h. c. Gassner, Braunschweig, Humboldtstr. 1 und Prof. Dr. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2.
Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47 oder an die Herausgeber: für Arbeiten aus Deutschland und Österreich an Prof. Gassner, für Arbeiten aus anderen Ländern an Prof. Gäumann.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. Gassner, Braunschweig. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Gassner vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen sind honorarfrei.
Honorar für die „Besprechungen" 48,— DM je Druckbogen.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 8 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Bogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 2,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich.
Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.


---


**Abonnementspreis dieses Heftes 21,80 DM** **Einzelpreis 23,80 DM**

*Soeben erschien:*

# Chemisches Praktikum

für Studierende der Landwirtschaft, der Tierheilkunde, des Gartenbaues und der landwirtschaftlichen Gewerbe

Von Prof. Dr. E. LEHMANN

Fakultät für Landbau der Technischen Universität Berlin

*3. verbesserte Auflage. 160 Seiten m. 17 Textabb. Kart. m. Leinenrücken 9,80 DM*

Das vorliegende, auf die Bedürfnisse der Studierenden der Landwirtschaft, der Tierheilkunde, des Gartenbaues und der landwirtschaftlichen Gewerbe zugeschnittene Praktikum strebt die Vermittlung analytischer Kenntnisse und Fertigkeiten an. Es erläutert einfach auszuführende Schauversuche, die fortschreitend mit präparativen Darstellungen und analytischen Nachweisreaktionen untermischt werden. Diese verbindende Unterrichtsweise hat sich im Anfänger-Unterricht gut bewährt, weil sie besonders geeignet ist, die Freude an eigener experimenteller Betätigung zu wecken, indem sie den Anfänger enger an die Stoffe und ihre Entstehung heranbringt, als die rein analytische Einführung es vermag.

---

# Zeitschrift für Pflanzenzüchtung

Begründet 1913 von C. FRUWIRTH und bisher in 30 Bänden erschienen

Herausgegeben von

Å. Åkerman, Svalöf — H. Kappert, Berlin-Dahlem — W. Rudorf, Voldagsen — H. Stubbe, Gatersleben — E. v. Tschermak, Wien

*Jährlich erscheint ein Band zu vier Heften in zwangloser Folge, das Heft umfaßt etwa sieben Druckbogen. Der Preis eines Heftes richtet sich nach dem Umfang, er beträgt je Druckbogen zu 16 Seiten etwa 2,80 DM*

Die „Zeitschrift für Pflanzenzüchtung" veröffentlicht in allen Kongreßsprachen Originalarbeiten, Sammelberichte, kurze Mitteilungen und Referate von Einzelarbeiten aus dem Gebiet der botanischen Züchtungsforschung und ihrer Grundlagen sowie der praktischen Züchtung von landwirtschaftlichen, gärtnerischen und forstlichen Nutzpflanzen.

Das demnächst erscheinende Heft 3 von Band 31 bringt voraussichtlich folgende Arbeiten:

R. v. Sengbusch, Ein weiterer Beitrag zur Vererbung des Geschlechts bei Hanf als Grundlage für die Züchtung eines monözischen Hanfes.

H. Hänsel, Studie über seitliche „Ausladung" und Anzahl der Keimwurzeln verschiedener Gerstensorten mit besonderer Berücksichtigung ihres Verhaltens nach Vernalisation.

M. Krickl, Eine praktisch erprobte Beobachtungs-, Aufarbeitungs- und Analysenmethode zur Auslese der geeigneten Pflanzen für die Maiszüchtung.

K. O. Müller und W. Black, Potato breeding for resistance to blight and virusdiseases during the last hundred years.

N. O. Frandsen, Untersuchungen zur Virusresistenzzüchtung bei *Phaseolus vulgaris* L.

VERLAG PAUL PAREY

# Zeitschrift für angewandte Entomologie

Zugleich Organ der Deutschen Gesellschaft für angewandte Entomologie

Begründet 1914 von K. ESCHERICH

Herausgeber: Prof. Dr. W. ZWÖLFER, München

Jährlich erscheint 1 Band zu 4 Heften in zwangloser Folge. Das Heft umfaßt etwa 10 Druckbogen zu 16 Seiten

*Bezugspreis je Druckbogen etwa 2,80 DM. Die Hefte werden einzeln berechnet*

Die „Zeitschrift für angewandte Entomologie" ist die führende internationale wissenschaftliche Zeitschrift und Mittelpunkt für die Forschungen und Interessen auf ihrem Spezialgebiet. Sie wird in allen bedeutenden entomologischen und biologischen Instituten der ganzen Welt gelesen. In den Originalarbeiten tritt der weite Umfang des Gebietes der angewandten Entomologie in Erscheinung, nämlich die Erforschung aller wirtschaftlich schädlichen und Krankheit erregenden und übertragenden Kerbtiere und ihre Bekämpfungsmöglichkeiten chemischer, technischer und biologischer Art, ferner die Erforschung der Biologie von direkt nützlichen Kerbtieren, wie Bienen, Seidenraupen usw. und der Möglichkeit der Förderung ihrer Zucht.

*Als Sonderdruck aus „Zeitschrift für angewandte Entomologie" erscheint:*

# Literatur zur HCH- und Diën-Gruppe. Liste III

Von

Dr. RANDOLPH RIEMSCHNEIDER und ELISABETH SCHÖLZEL

*etwa 140 Seiten auf Kunstdruckpapier im Format der Zeitschrift*
*Subskriptionspreis kart. 22,— DM*

Die Zahl der Veröffentlichungen auf dem Gebiet der „Kontakt-Insektizide auf Halogenkohlenwasserstoffbasis" ist in den letzten Jahren außerordentlich angestiegen. Der einzelne kann das Gebiet der synthetischen Insektizide nur noch mit Mühe übersehen. Nur wenige Stellen verfügen über umfassende Literatur. — In vorliegender Arbeit geben die Verfasser das von ihnen bis Juli 1951 registrierte Literaturmaterial über die Insektizide der HCH- und Diën-Gruppe bekannt, und zwar über 3000 Titel mit Angaben von Referaten, Schwerpunkt der Arbeit (chemisch, physikalisch oder biologisch) und behandelter Insektizid-Gruppe. Unter Diën-Gruppe sind die neueren Insektizide wie „1068", M 410, chlordan, aldrin, dieldrin und andere zusammengefaßt. Die Insektizide der Terpen-Gruppe (Toxaphen u. a.) wurden miteinbezogen; zur HCH-Gruppe gehören Hexachlorcyclohexan und verwandte Verbindungen.

Wir laden hiermit zur Subskription ein und bitten um baldmöglichste Aufgabe der Bestellung Voraussichtlicher Erscheinungstermin August 1952. Mit Erscheinen des Sonderdrucks erlischt der ermäßigte Subskriptionspreis. Alsdann beträgt der Ladenpreis 25,— DM

# Anzeiger für Schädlingskunde

Die Fachzeitschrift für die praktische Schädlingsbekämpfung

Zugleich Nachrichtenblatt der „Deutschen Gesellschaft für angewandte Entomologie e. V."

Begründet 1925 von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. h. c. K. ESCHERICH und Prof. Dr. F. STELLWAAG

Herausgeber: Dr. H. W. FRICKHINGER, Irschenhausen bei München

*Erscheinungsweise: monatlich. Bezugspreis: vierteljährlich 7,50 DM zuzügl. Versandkosten*

Die Zeitschrift berichtet interessant und anregend in Originalaufsätzen und Berichten hervorragender Wissenschaftler und Fachkenner über das Auftreten von Schädlingen in aller Welt, die Entwicklung der Mittel und Methoden der Schädlingsbekämpfung im In- und Ausland und die praktische Anwendung neuer Mittel zur Bekämpfung tierischer Schädlinge.

VERLAG PAUL PAREY



Verlag Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstraße 44-47 (West-Berlin). Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Gassner, (20b) Braunschweig, Humboldtstraße 1 und Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2, Printed in Germany Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36 (West-Berlin).


Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten.


Erscheinungsweise: Jährlich 8 Hefte (4 Hefte = 1 Band).

BAND 19, HEFT 4 SEPTEMBER 1952

# PHYTOPATHOLOGISCHE ZEITSCHRIFT

Begründet von Prof. Dr. E. Schaffnit

*Unter Mitwirkung von*

Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. O. Appel-Berlin, Prof. Dr. E. Baldacci-Mailand, Prof. Dr. H. Braun-Bonn, Prof. Dr. W. B. Brierley-Reading, Prof. Dr. Takewo Hemmi-Kyoto, Oberreg.-Rat Dr. E. Köhler-Celle, Prof. Dr. K. O. Müller-Cambridge, Prof. Dr. H. M. Quanjer-Wageningen, Prof. Dr. Tr. Savulescu-Bukarest, Prof. Dr. E. C. Stakman-St. Paul

*herausgegeben von*

Prof. Dr. Dr. h. c. **G. Gassner** Braunschweig und Prof. Dr. **E. Gäumann** Zürich

Mit 37 Abbildungen

1952

PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

*Phytopath. Z. Bd. 19,* **Heft 4,** *S. 389—484, Berlin 1952*

# INHALT

**Abhandlungen**

Hochapfel, H., Die Cylindrosporium-Krankheit an Süß- und Sauerkirschen in Europa und Nordamerika. (Mit 6 Abb.) ..... 389

Müller, E., Pilzliche Erreger der Getreideblattdürre. (Mit 6 Abb.) ..... 403

Blumer, S., Über zwei Schimmelpilze auf den Blütenständen von *Poinsettia pulcherrima* Willd. (Mit 4 Abb.) ..... 417

Verona, O. e Gambogi, P., Una ricerca sull'azione della citrinina prodotta da *Penicillium citrinum* Thom su funghi fitopatogeni. (7 Fig.) ..... 423

Zobrist, L. und Fröhlich, H., 10 Jahre Versuche zur Bekämpfung des Apfelmehltaues (*Podosphaera leucotricha* [E. et E.] Salm.). (Mit 4 Abb.) ..... 431

Warmbrunn, K., Untersuchungen über den Zwergsteinbrand. (Mit 10 Abb.) ..... 441

**Kurze Mitteilungen**

Sauthoff, W., Über Stoffwechselprodukte bei *Botrytis cinerea* Pers. ..... 483

---

**Manuskripte:** In deutscher, englischer, französischer oder italienischer Sprache abgefaßte Originalarbeiten werden druckfertig und möglichst in Schreibmaschinenschrift erbeten. Aufnahme von Tabellen und Abbildungen unterliegt jeweils vorheriger Vereinbarung.
„Kurze Mitteilungen" sind solche Veröffentlichungen in den vorerwähnten Sprachen, die im allgemeinen einen Umfang von vier Druckseiten nicht übersteigen. Sie erscheinen möglichst schon im nächsten Heft.
Die „Besprechungen" erscheinen nur in deutscher Sprache.

**Schriftleitung:** Prof. Dr. Dr. h. c. Gassner, Braunschweig, Humboldtstr. 1 und Prof. Dr. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstr. 2.
Zusendung der Manuskripte von Originalarbeiten und „Kurzen Mitteilungen" entweder an den Verlag Paul Parey, Berlin SW 68, Lindenstraße 44/47 oder an die Herausgeber: für Arbeiten aus Deutschland und Österreich an Prof. Gassner, für Arbeiten aus anderen Ländern an Prof. Gäumann.
Zusendung der „Besprechungen" unmittelbar an Prof. Gassner, Braunschweig. Soweit nicht eine Aufforderung der Herausgeber zur Besprechung bestimmter Arbeiten ergangen ist, empfiehlt es sich, Prof. Gassner vorher von der Absicht der Besprechung zu verständigen.

**Honorierung:** Das Mitarbeiterhonorar für Originalarbeiten und „Kurze Mitteilungen" beträgt 32,— DM je Druckbogen von 16 Seiten. Bei Beiträgen von mehr als drei Bogen werden nur die ersten drei Bogen honoriert; Dissertationen sind honorarfrei.
Honorar für die „Besprechungen" 48,— DM je Druckbogen.

**Sonderdrucke:** Jeder Mitarbeiter erhält unberechnet 20 Sonderdrucke seines Beitrages (Originalarbeiten und Kurze Mitteilungen). Mehrbedarf gegen Berechnung.

**Erscheinungsweise:** Die Zeitschrift erscheint in zwangloser Folge. Jährlich erscheinen etwa 8 Hefte, von denen 4 einen Band bilden. Jeder Band enthält etwa 30 Bogen.

**Bezugsbedingungen:** Der Preis des Bandes richtet sich nach dem Umfang. Er beträgt je Druckbogen von 16 Seiten etwa 2,75 DM. Die Hefte sind auch einzeln käuflich.
Das Abonnement verpflichtet zum Bezug eines ganzen Bandes. Es verlängert sich jeweils, falls nicht spätestens unverzüglich nach Eingang der letzten Lieferung des berechneten Bandes Abbestellung erfolgt.

---

**Abonnementspreis dieses Heftes 19,60 DM** **Einzelpreis 21,60 DM**

## Kartoffelkrankheiten

I. Teil: Knollenkrankheiten (Pareys Taschenatlanten Nr. 1)

Herausgegeben von Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. Dr. h. c. O. APPEL

*4. Auflage, 24 farbige Tafeln mit 40 Seiten Text, kartoniert 6,— DM*

Ein Atlas in Taschenformat, in dem, durch bunte Tafeln ausgezeichnet illustriert, die Erscheinungsformen der Knollenkrankheiten der Kartoffel wissenschaftlich-sachlich erläutert werden. In Fäulnisarten, Außenerkrankungen, Innenerkrankungen und tierische Fraßbeschädigungen eingeteilt, wird ein für den Züchter und die gesamte landwirtschaftliche Praxis unentbehrlicher Überblick gegeben, wobei auch auf die zur Bekämpfung der Krankheiten zu treffenden Maßnahmen hingewiesen ist.

## Krankheiten und Schädlinge der landwirtschaftlichen und gärtnerischen Kulturpflanzen und ihre Bekämpfung

Für Praxis und Studium

Von Prof. Dr. H. BRAUN und Dr. E. RIEHM

6. Auflage bearbeitet von Prof. Dr. H. BRAUN

*352 S. m. 243 Textabb., kartoniert 20,— DM, Halbln. geb. 22,— DM*

In diesem von der Fachwelt als Glanzleistung bezeichneten Werk ist größter Wert auf möglichst erschöpfende Beschreibung der Krankheitssymptome gelegt worden, um mit Hilfe der Bestimmungsschlüssel die richtige Diagnose stellen zu können. Besonders charakteristische Aufnahmen von Schadensbildern dienen dem gleichen Zweck. Durch eingehende Erörterungen der krankheitsbegünstigenden Umweltsbedingungen wird der Wert der Hygiene im Kampf gegen Krankheiten und Schädlinge klar herausgestellt.

## Krankheiten und Schädlinge im Obstbau und ihre Bekämpfung

Von Prof. Dr. W. KOTTE

*2. neubearb. Aufl., 337 S. m. 213 Textabb. und 8 farbigen Tafeln, kart. 24,— DM, Halbln. geb. 25,60 DM*

Das hervorragend ausgestattete Werk behandelt in anschaulicher und umfassender Darstellung alle Krankheiten und Schädlinge im Obstbau sowie die praktischen Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung. Es wird von allen Fachleuten als eines der besten auf diesem Gebiet anerkannt.

---

VERLAG PAUL PAREY

Zur Fortsetzung erscheinen wieder:

# Mitteilungen aus der Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft

## Berlin-Dahlem

Herausgegeben von der
Biologischen Zentralanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem
in Gemeinschaft mit der Biologischen Bundesanstalt in Braunschweig

Die Hefte erscheinen in zwangloser Folge als Fortsetzung der „Mitteilungen aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft in Berlin-Dahlem" und werden einzeln berechnet.

*Seit dem Kriege erschienen bisher:*

Heft 68

**Bücher über Pflanzenpathologie und Pflanzenschutz**

Eine Bibliographie
Bearbeitet von Prof. Dr. H. Morstatt
*Februar 1950. 52 Seiten, brosch. 6,— DM*

Heft 69

**Über die Wirkung des Rapserdflohlarven-Befalls auf die Rapspflanze**

Von Dr. Dora Godan
*September 1950. 35 Seiten m. 17 Abb., brosch. 4,— DM*

Heft 70

**Pflanzenschutz-Tagung**

der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig in Goslar, 11.—14. Oktober 1950
*Februar 1951. 140 Seiten m. 12 Abb., brosch. 12,— DM*

Heft 71

**Die Überträger pflanzlicher Viruskrankheiten**

Von Dr. Kurt Heinze
*Juli 1951. 127 Seiten, brosch. 15,— DM*

Heft 72

**Wollschäden und Dauerschutz der Wolle durch „Eulan"-Behandlung**

Von Albrecht Hase
*Oktober 1951. 56 Seiten m. 14 Abb., brosch. 5,— DM*

Heft 73

**Untersuchungen zur anholocyclischen Überwinterung der grünen Pfirsichlaus**
(*Myzodes persicae* Sulz.) an Brassicaceen

Von W. Steudel
*Januar 1952. 32 Seiten m. 8 Abb. und 5 Tabellen, brosch. 4,— DM*

Heft 74

**Pflanzenschutz-Tagung**

der Biologischen Bundesanstalt Braunschweig in Würzburg, 23.—25. Oktober 1951
*März 1952. 168 Seiten, brosch. 20,— DM*

Die „Mitteilungen" setzen die wissenschaftliche Tradition der früheren Biologischen Reichsanstalt fort, sie informieren die Land- und Forstwirtschaft, den Garten-, Obst- und Weinbau über die Forschungsergebnisse der Wissenschaft und geben der weitverzweigten Industrie der Pflanzenschutzmittel wertvolle Anregungen.

*Auslieferung durch*

VERLAG PAUL PAREY IN BERLIN UND HAMBURG

Berlin SW 68 (West-Berlin), Lindenstraße 44/47

Verlag Paul Parey, (1) Berlin SW 68, Lindenstraße 44-47 (West-Berlin). Herausgeber: Prof. Dr. Dr. h. c. G. Gassner, (20b) Braunschweig, Humboldtstraße 1 und Prof. Dr. E. Gäumann, Zürich 6, Universitätsstraße 2. Printed in Germany Druck von A. W. Hayn's Erben, Berlin SO 36 (West-Berlin). Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des auszugsweisen Nachdrucks und der photomechanischen Wiedergabe, vorbehalten. Erscheinungsweise: Jährlich 8 Hefte (4 Hefte = 1 Band).